

**Präparative und analytische Untersuchungen an der
D-β-Hydroxybuttersäuredehydrogenase (EC 1.1.1.30)
aus Rattenlebermitochondrien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie**

**vorgelegt
von
Peter Gratz
aus
Philippsthal/Werra**

Giessen, Frühjahr 1973

**Präparative und analytische Untersuchungen an der
D-β-Hydroxybuttersäuredehydrogenase (EC 1.1.1.30)
aus Rattenlebermitochondrien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie**

vorgelegt

von

Peter Gratz

aus

Philippsthal/Werra

Giessen, Frühjahr 1973



D 26

Dekan: Prof. Dr. Lueken

I. Berichterstatter: Prof. Dr. Staudinger

II. Berichterstatter: Prof. Dr. Cleffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 6. 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 Einleitung	1
2.0 Problemstellung	3
3.0 Material und Methoden	4
3.1 Material	4
3.1.1 Versuchstiere	4
3.1.2 Chemikalien	4
3.2 Methoden	9
3.2.1 Gewinnung von Rattenlebermito- chondrien	9
3.2.1.1 Alkalische Extraktion	9
3.2.1.2 Reaktivierung des Enzyms	10
3.2.2 Proteinbestimmung	10
3.2.2.1 Proteinbestimmung nach der Biuretmethode	10
3.2.2.2 Proteinbestimmung mit Folinreagenz	11
3.2.2.3 Spektralphotometrische Proteinbestimmung	11
3.2.3 Reinigung von PC, Reinheitsnach- weis, Phosphatbestimmung	11
3.2.3.1 Aufbewahrung von PC	13
3.2.3.2 Herstellung von micel- larem PC	13
3.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität	14
3.2.5 Methodik der Stabilisierungs- versuche	14
3.2.6 Methodik der Versuche zur An- reicherung der β -OHDH	15
3.2.6.1 QAE-Sephadex A 50-Säu- lenchromatographie	15

3.2.6.2 Isoelektrische Focus-	
sierung	16
3.2.6.3 Sepharose 2B- und 6B-	
Säule	16
3.2.7 Analytische Untersuchung des al-	
kalischen Extrakts	17
3.2.7.1 Untersuchungen des Extrakts	
mit Hilfe der analytischen	
Ultrazentrifuge	17
3.2.7.2 Gelchromatographie und SDS-	
gelchromatographie	17
3.2.7.3 Diskelektrophoretische	
Untersuchungen	18
3.2.8 Versuche zur Dissoziation der	
Proteinkomponenten	19
3.2.8.1 Chaotrope Ionen	19
3.2.8.2 Enzymatischer Aufschluß	20
3.2.8.3 Aufschluß mit Detergentien	20

4.0 Ergebnisse

4.1 Zur Frage der Stabilität der solubilisierten	
B-OH ₂ DH	21
4.1.1 Untersuchung der Bindungsart des	
Protein-PC-Komplexes	22
4.2 Versuche zur Isolierung der B-OH ₂ DH	24
4.2.1 Versuche zur Anreicherung durch	
Säurefällung	24
4.2.2 Chromatographie des alkalischen	
Extrakts an QAE-Sephadex A 50	26
4.2.3 Elektrofocussierung des Apoen-	
zyms	28

4.2.4 Versuch einer Anreicherung des mit PC reaktivierten Apoenzyms über Sepharose Säulen	30
4.3 Analytische Untersuchungen an dem nach al- kalischer Extraktion von Mitochondrienfrag- menten erhaltenem Extrakt	35
4.3.1 Untersuchung des alkalischen Extrakts mit Hilfe der analy- tischen Ultrazentrifugation	35
4.3.1.1 Korrelation des Sedi- mentationsverhaltens des alkalischen Extrakts mit dessen zeitlich abnehmen- der Reaktivierbarkeit	37
4.3.2 Gelchromatographische Untersu- chungen des Extrakts	39
4.3.2.1 Gelfiltration des Extrakts mit Hilfe von Sephadex G-150, G-200 sowie mit Sepharose 6B	39
4.3.2.2 Gelfiltration des mit SDS vorbehandelten Extrakts	43
4.3.3 Diskelektrophoretische Unter- suchungen des mit SDS vorbehan- delten sowie nicht vorbehandelten Extrakts	45
4.3.3.1 SDS-Diskelektrophore- tische Untersuchungen der beiden Proteinpeaks der Se- phadex G-200-Säule	46
4.4 Versuche zur Dissoziation der die Aktivi- tät enthaltenden Proteinkomponenten	49
4.4.1 Die Wirkung von chaotropen Ionen	51

4.4.2 Proteolytische Verdauung des Enzyms	51
4.4.3 Aufschluß mit Detergentien	52
5.0 Zusammenfassung der Ergebnisse	56
6.0 Diskussion	58
7.0 Literaturnachweis	64

Verwendete Abkürzungen

NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
Spez. Akt.	Spezifische Aktivität
K_m	Michaelis-Konstante
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
BOH	β -Hydroxybuttersäure
β -OHDH	β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase
PC	Phosphatidylcholin
LPC	Lysolecithin
PE	Phosphatidyläthanolamin
SDS	Dodecylsulfat
MG	Molekulargewicht

1.0 Einleitung

D- β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (E.C. 1.1.1.30) wurde zuerst von Green, Dewan, Leloir (1) beschrieben, die das Enzym von der Malat- und Lactatdehydrogenase abgrenzten und seine Spezifität für das D-Isomere des Substrats sowie für NAD bewiesen.

Das Enzym wurde in den Geweben vieler Wirbeltiere nachgewiesen. (2-6). Auch in Bakterien und Pflanzen wurden Enzyme mit β -OHDH-Aktivität gefunden. (7-9).

In Leber- und Herzmuskelzellen ist D- β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase an die innere Membran der Mitochondrien gebunden. (10-11). Die höchste spezifische Aktivität dieses Enzyms wird in Rattenlebermitochondrien gemessen. (2). Deshalb sind Rattenlebermitochondrien das bevorzugte Ausgangsmaterial zur Isolierung der strukturgebundenen β -OHDH.

Bis 1960 war es nur zu einer begrenzten Reinigung durch Ziegler et al. (12) gekommen, die Mitochondrien mit Hilfe der Ultraschallung aufgeschlossen hatten. Mit dieser Reinigungsmethode gelang jedoch weder eine nach den Kriterien von Penefsky (13) abgesicherte Solubilisierung noch eine Abtrennung von Hämkomponenten der Atmungskette. Green und Mitarbeiter (14-16) beobachteten, daß durch Detergentien das Enzym aus der Lipidphase der Membran herausgelöst wird und dabei seine katalytischen Eigenschaften verliert. Durch Inkubation mit micellarem PC konnte das Enzym reaktiviert werden. (15,16).

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen muß angenommen werden, daß Lecithin das einzige Phospholipid mit Effektorwirkung auf die β -OHDH ist. (17-19) .

Die bis heute beschriebenen Methoden zur Solubilisierung des Proteins führen zu einem Apoenzym, das erst nach Inkubation mit PC Aktivität zeigt.

Fleischer (17) hat durch Behandlung mit Phospholipase A die β -OHDH solubilisiert. Als wahrscheinliche Ursache für die Lösung des Enzyms ist die Entstehung von LPC anzusehen, das die Eigenschaft eines Detergenz besitzt. Gotterer (18,19) hat das Enzym bei pH-Werten zwischen 10 und 10,5 aus Mitochondrienfragmenten extrahiert. In stark alkalischem Milieu wird eine Sprengung des Membranverbandes durch elektrostatische Abstoßung der einseitig negativ geladenen Proteine und Phospholipide erreicht.

Die physiologische Bedeutung des Enzyms könnte nach Devlin und Bedell (20) in dem Transport von Reduktionsäquivalenten durch die Mitochondrienmembran begründet liegen. Klingenberg und Häfen (21) schreiben der β -OHDH Regulationsfunktion für den Redoxlevel in Mitochondrien verschiedener Gewebe zu.

2.0 Problemstellung

Durch alkalische Extraktion ultrabeschallter Mitochondrienfragmente wird eine reaktivierbare Präparation des Apoenzyms (Gotterer, 18) erhalten, die frei ist von Detergentien und nach den Ergebnissen der spektralphotometrischen Analyse keine Flavo- oder Hämoproteide enthält. Die nach Gotterer (18) angereicherte β -OHDH erschien uns deshalb als das geeignete Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen. In diesem Extrakt, der pro mg Protein noch 1/6 des in intakten Mitochondrien vorhandenen Lipids besitzt, wurden Fremdproteine als Fremdaktivitäten nachgewiesen. Ziel unserer Arbeit war es:

- 1) den alkalischen Extrakt von Gotterer (18)
proteinchemisch zu charakterisieren
- 2) die in dem Extrakt nachgewiesenen Fremd-
proteine von der β -OHDH abzutrennen
- 3) Eigenschaften des Enzymprotein: PC-Komplexes
aufzuklären

3.0 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden spezifisch pathogenfreie Wistar-Albinoratten (200-270 g) verwandt, die in klimatisierten Räumen bei 20 - 22°C unter konventionellen Bedingungen gezogen wurden. Die Ratten wurden mit Altromin^R-Standarddiät gefüttert und erhielten Wasser ad libidum. Den Tieren wurde 12 Stunden vor dem Schlachten das Futter entzogen, um den Glykogengehalt der Leber herabzusetzen.

3.1.2 Chemikalien

Fa. Merck AG, Darmstadt:

Natriumchlorid p.a.; Kaliumchlorid p.a.; Kaliumcarbonat p.a.; Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat p.a.; di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.; tri-Natriumphosphat-12-hydrat reinst; Kaliumdihydrogenphosphat p.a.; di-Kaliumhydrogenphosphat p.a.; tri-Kaliumphosphat-7-hydrat p.a.; Natriumhydroxyd p.a. Plätzchen; Ammoniumsulfat für biochemische Zwecke; Kaliumcyanid p.a.; Salzsäure 25% p.a.; Trishydroxymethylaminomethan p.a.; Trichloressigsäure p.a.; Methanol für Chromatographie und Analyse; Chloroform für Chromatographie und Analyse; Saccharose reinst; Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz p.a.; Kaliumnatriumtartrat p.a.; Wismutnitrat basisch p.a.; L-Weinsäure p.a.; Wismutcarbonat basisch, reinst DAB 6; Folin Ciocalteus Phenolreagenz; Natriumazid.

Fa. Riedel-de Haen AG, Seelze - Hannover

Kupfersulfat p.a.; Kaliumjodid p.a.; Kaliumnatriumtartrat p.a.; Jod DAB 6

Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

ß Nicotinsäureamid- Adenin- dinucleotid, freie Säure;,
Reinheitsgrad II; Cytochrom c aus Pferdeherz, kristallisiert und salzfrei;

Fa. Serva GmbH u. Co., Heidelberg

DL-ß-Hydroxybuttersäure-Natriumsalz rein;

Fa. Fluka GmbH, Eschborn

1-Thioglycerin (3-Mercapto-1,2,-propandiol purissimum)

Behringwerke AG, Marburg/Lahn

Gamma-Globulin vom Rind, reinst; Serumalbumin vom Rind
reinst;

Für die Herstellung von PC verwendete Chemikalien

Fa. Merck AG, Darmstadt

Lecithin aus Eiern, reinst; Ammoniumheptamolybdat p.a.;
Natriumdisulfit p.a.; Natriumsulfit wasserfrei p.a.;
Perchlorsäure 70% p.a.; Kieselgel H nach Stahl für Dünnschichtchromatographie, n-Butanol p.a.; Methanol reinst;
Magnesium (Späne nach Grignard, LAB); Kaliumpermanganat p.a.; Calciumchlorid, mittelfein gekörnt für Trocknungszwecke; Natriumsulfat, wasserfrei p.a.

Fa. Serva GmbH u. Co., Heidelberg

Kieselgel Mallinckrodt p.a., 100 mesh; Hyflo Super Cel 5-25µ

Fa. Woelm, Eschwege

Magnesiumsilikat für Dünnschichtchromatographie

Fa. Riedel-de Haen AG, Seelze - Hannover

1-Amino- 2-hydroxy-naphthalinsulfonsäure- (4) zur Phosphatbestimmung

Fa. Hoechst AG, Frankfurt/Main

Chloroform (DAB 7)

Für Stabilisierungsversuche verwendete Chemikalien

Fa. Merck AG, Darmstadt

Methanol p.a.; Äthanol p.a.; n-Butanol p.a.; Aceton p.a.; Glycerin doppelt destilliert (etwa 87%) p.a.; Glutathion (reduziert) für biochemische Zwecke (LAB); Lithiumchlorid p.a.; Magnesiumchlorid p.a.; Eisen-II-chlorid p.a.;

Fa. Serva GmbH u. Co., Heidelberg

Dithioerythrit rein

Apotheker Bernhard und Buxmann, POS Saarbrücken

Tetracainum POS 2%

Sorptionsmittel für die Chromatographie

Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden

Sephadex G-75, G-100, G-150, G-200

Sepharose 6B, 2B;

QAE-Sephadex A 50, Kapazität 3,0 $\pm$ 0,4 meq/g

Chemikalien für die Isoelektrische Focussierung

Fa. LKB, Stockholm/Schweden

Ampholine pH 3-5; Ampholine pH 3-10;

Fa. Merck AG, Darmstadt

ortho-Phosphorsäure 85%, reinst DAB 7; Äthylendiamin LAB

Chemikalien für die Diskelektrophorese

Fa. Merck AG, Darmstadt

Glykokoll p.a.; Essigsäure 96% p.a.; Ammoniumperoxodisulfat p.a.; Riboflavin für biochemische Zwecke;

Fa. Serva GmbH u. Co., Heidelberg

Acrylamid für Diskelektrophorese; N,N,N',N' - Tetramethyl-äthylendiamin (Temed) für Acrylamid-Polymerisation; N,N'-Methylen-Bisacrylamid zur Gelvernetzung; Dodecylsulfat-Natriumsalz, krist., reinst; Amidoschwarz 10 B reinst; Coomassie Brillant Blau R-250 rein;

Fa. Fluka GmbH, Eschborn

Acrylamid purum;

Chemikalien für Solubilisierungsversuche

Fa. Merck AG, Darmstadt

Äthylenglykol p.a.; Guanidiniumchlorid für biochemische Zwecke (LAB); α -Protease, Harnstoff p.a.; Natriumperchlorat p.a.; Natriumthiocyanat rein, tert. Amylalkohol p.a.;

Fa. Fluka GmbH, Eschborn

Polyäthylenglykol 1500, Polyäthylenglykol 6000, Polyäthylenglykol 20.000;

Fa. Serva GmbH u. Co., Heidelberg

Triton X-100 (Octylphenol-decaäthylenglykoläther);
Triton N-101 (Octylphenyläthylenglykoläther); Triton
X-114 (Octylphenoxyäthoxyäthanol); Tween 20 (Lauryl-
sorbitanpolyäthylenglykoläther); Tween 60 (Stearylpoly-
äthylenglykoläther);

Fa. Henkel u. Cie, Düsseldorf

Eumulgin 286 (Alkyl-Arylpolyäthylenglykoläther)
Lubrol (Kondensat aus Cetylalkohol und Poly äthylenäther)

Deutsche Shell Chemie

Lensodel NP 40, NP 80 (nichtionische Kondensate aus
Äthylenoxid und Octylphenol) Geschenk der Shell Chemie

Fa. Boehringer GmbH, Mannheim

Papain; Trypsin;

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von Rattenlebermitochondrien

Die Mitochondrien wurden nach der Methode von Schneider und Hogeboom (22) hergestellt und nach Gotterer (18) mit 0,25 M Saccharose gewaschen bis durch Zentrifugation bei 5.000 g ein klarer Überstand erhalten wurde. Die gewaschenen Mitochondrien wurden in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer-/0,001 M EDTA pH 8,2 aufgenommen.

Der Proteingehalt der Suspension wurde auf 50 mg/ml eingestellt. Je 25 ml der so erhaltenen Präparation wurden 10 Minuten in einem Doppelwandkühlgefäß (Innerer Durchmesser: 3 cm; Höhe 7 cm) mit der Makrospitze (Stufe 8, Intensität 7,5-8) eines "Branson Sonic Power" Ultraschallgerätes beschallt. Während der Beschallung wurde die Suspension gekühlt, wodurch ihre Temperatur zwischen 0 und 4°C gehalten wurde. Nach Zusatz von 1/5 des Volumens 2,5 M KCl wurden die erhaltenen Mitochondrienfragmente bei 105.000 g abzentrifugiert (60 Min.) und das Sediment bei -20°C gelagert. Die Aktivität der β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase blieb 3-4 Wochen ohne meßbaren Verlust erhalten.

3.2.1.1 Alkalische Extraktion

Das pH-Optimum für die alkalische Extraktion der β -OHDH wurde bei jeder Präparation nach Beschallung der Mitochondrien neu ermittelt. Die Mitochondrienfragmente wurden in 0,1 M Kaliumphosphat-/ 0,1 M Kaliumcarbonat-/ 0,01 M Thioglycerinpuffer (pH 9,5) aufgenommen. Der pH wurde

sukzessiv durch Zutropfen von 0,4 M KOH erhöht. Beim Erreichen der pH-Werte: 9,5; 10,0; 10,3; 10,5 wurde jeweils 1 ml entnommen. Nach 1-stündiger Zentrifugation bei 105.000 g wurden die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Überstände bestimmt. Alle übrigen Chargen einer Präparation wurden bei dem durch die Probeextraktion ermittelten pH-Optimum solubilisiert. (Die pH-Optima lagen zwischen 10,0 und 10,5) Der pH des Extrakts wurde für die gelchromatographischen Untersuchungen sowie für einen Teil der Solubilisierungsversuche mit 0,1 M Kaliumhydrogenphosphatlösung bis auf pH 7,4 gesenkt.

3.2.1.2 Reaktivierung des Enzyms

Nach Säulenchromatographie mußten häufig eine große Anzahl von Reaktivierungen durchgeführt werden. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die von Gotterer (18) hierfür angegebene Methode modifiziert, indem das Volumen des Präinkubationsansatzes bei gleicher relativer Zusammensetzung auf 0,5 ml erhöht wurde. Die Durchführung erfolgte in 2 ml fassenden Mikroreagenzgläsern.

3.2.2 Proteinbestimmung

3.2.2.1 Proteinbestimmung nach der Biuretmethode

Protein wurde mit Biuretreagenz bestimmt. (Beisenherz et al, 23). Durch Trübung hervorgerufene unspezifische Extinktionen wurden nach Bode et al (24) korrigiert. Für die Erfassung von Proteinmengen zwischen 50 und 500 μ g wurde die gleiche Methode im Mikromaßstab ausgeführt.

3.2.2.2 Proteinbestimmung mit Folin-Reagenz

Die Proteinbestimmung von Lowry et al (25) wurde in der Modifikation von Wallenfels (26) ausgeführt. Diese Methode wurde bei Proteinkonzentrationen zwischen 30- und 80 μ g/ml verwendet.

3.2.2.3 Spektralphotometrische Proteinbestimmung

Diese Methode wurde herangezogen, um nach der Isoelektrischen Focussierung bzw. säulenchromatographischen Trennverfahren eine rasche Auffindung von Protein zu erhalten. Die Durchführung erfolgte nach der spektralphotometrischen Bestimmungsmethode von Kalckar (27) bei 260 und 280 nm am Zeiss-Spektralphotometer. Die Methode ist in unserem Fall aufgrund der hohen Extinktion bei 260 nm quantitativ nicht anwendbar.

3.2.3 Reinigung von PC, Reinheitsnachweis, Phosphatbestimmung

Zur Isolierung von PC wurden die verwendeten Lösungsmittel Chloroform und Methanol vorgereinigt:

Chloroform: Ein Teil Chloroform wurde mit 1/10 Teil des Volumens 0,1% Kaliumpermanganatlösung ca. 5 Minuten in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Das abgelassene Chloroform wurde mehrere Male mit 1/6 Volumenteil Wasser ausgeschüttelt und nach 24-stündigem Trocknen mit Calciumchlorid über eine Kolonne destilliert.

Methanol: Zwei bis drei Tage über wasserfreiem Natriumsulfat vorgetrocknetes Methanol wurde mit 5 g Magnesiumspänen pro Liter Methanol 3-4 Stunden am Rückflußkühler gekocht und anschließend destilliert.

Die Isolierung von PC erfolgte in Anschluß an Hanahan et al (28) :

Kieselsäure (Mallinckrodt) wurde nach 12-stündigem Trocknen bei 105°C mit Hyflo Super Cel (5-25 μ) im Verhältnis 2:1 (G/G) gemischt und 2-3 Tage mit einem Chloroform/Methanol Gemisch 4:1 (V/V) äquilibriert. Das so vorbereitete Material wurde in eine Säule gefüllt. Nach dem Absetzen wurden pro 100 g Kieselsäure (Trockengewicht) 1,4 g in 15 ml Chloroform/Methanol 4:1 (V/V) gelöstes Rohlecithin aufgetragen. Danach wurden zunächst die Fettsäuren und PE mit Elutionsmittel gleicher Zusammensetzung ausgewaschen. Bei einer Säulenfüllung, die 200 g Kieselsäure (Trockengewicht) enthält, beträgt die Menge des hierzu erforderlichen Elutionsmittels etwa 1.000-1.200 ml. Anschließend wurde mit Chloroform/Methanol 3:2 (V/V) PC eluiert.

Dünnschichtchromatographie der Lipide:

Bei dem dünnschichtchromatographischen Reinheitsnachweis wurde eine nach Schnellbacher (29) modifizierte Methode von Debuch et al (30) angewandt.

Herstellung der Platten:

20 g Kieselgel H nach Stahl wurden mit 2 g Magnesiumsilikat und 65 ml Wasser zu einem homogenen Brei verrieben und mit einem Streichgerät (C. Desaga, Heidelberg) in einer Dicke von 300-375 μ aufgetragen. Die an der Luft getrockneten Platten wurden vor Gebrauch durch 30-minütiges Erhitzen im Trockenschrank bei 110°C aktiviert. Die Phospholipidlösung wurde mit einer Glaskapillare aufgetragen.

Die Trennung der aufgetragenen Substanzen erfolgte in einer Kammer, die als Laufmittel Chloroform, Methanol, Wasser im Verhältnis (V/V/V) 97:37:6 enthielt. Zur Entwicklung wurden die Platten in eine Jodkammer gestellt. Der qualitative Nachweis von PC erfolgte mit Dragendorff's Reagenz. Phosphor wurde nach Debuch et al (30) bestimmt.

3.2.3.1 Aufbewahrung von PC

Die in Chloroform/Methanol 3:2 (V/V) erhaltenen Fraktionen mit gelöstem PC wurden nach dem Reinheitsnachweis gepoolt und bei 40°C am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das farblose Lecithin wurde in Benzol aufgenommen. (10mg/ml) und in Chargen von 6 ml in Schliffreagenzgläsern bei -20°C gelagert.

3.2.3.2 Herstellung von micellarem PC

Die benzolische Lösung wurde wie oben beschrieben am Rotationsverdampfer zu Trockne eingeeengt und anschließend in 6 ml Puffer (25 mM Tris-Cl pH 8,1) aufgenommen. Durch 10-minütige Beschallung in einem Doppelwandkühlgefäß (Innendurchmesser: 1,5 cm, Höhe: 3,5 cm) mit. o. a. Beschallgerät (Stufe 3, Intensität 3-4) wurde das PC micellar verteilt. Während dieser Beschallung wurde die Temperatur der Suspension auf 0-4°C gehalten. Zur Reaktivierung des Enzyms wurde der nach 1-stündiger Zentrifugation bei 105.000 g erhaltene Überstand der Suspension verwendet. Die Lösungen durften aufgrund der Reaggregation des Lipids nicht länger als 5 Stunden nach Herstellung verwendet werden.

3.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Die NAD-Reduktion wurde mit dem optischen Test im Eppendorf-Photometer gemessen. Die Extinktionsänderung bei 366 nm wurde mit einem Linienschreiber registriert. Die Durchführung der Messungen erfolgte bei 25°C in thermostatisierten 1 cm OS-Küvetten. Die Ansätze enthielten 75 mM Tris-Cl pH 8,1; 1 mM NAD; 11mM BOH sowie wechselnde Mengen Protein in einem Endvolumen von insgesamt 2 ml. Nachdem die Extinktion des Ansatzes ohne BOH einen konstanten Wert erreicht hatte, wurde durch Zugabe des Substrats (BOH) die Reaktion gestartet. Die spezifischen Aktivitäten wurden in $\mu\text{Mol reduziertes NAD} \times \text{mg Protein}^{-1} \text{min}^{-1}$ berechnet. Als molarer Extinktionskoeffizient bei 366 nm wurde $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

3.2.5 Methodik der Stabilisierungsversuche

Zur Stabilisierung wurde der wie unter 3.2.1.1 gewonnene Extrakt (pH 10,5 und pH 7,4) nach Variierung der Methoden von Gilvery, Racker, Takemori (31,32,33) mit verschiedenen Reagenzien inkubiert. Dabei wurden der Enzymlösung mono- und bivalente Kationen (Li^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), reduzierende Substanzen (reduziertes Glutathion, Dithioerythrit) sowie EDTA, Substrat, Cosubstrat in Konzentrationen zwischen 10^{-4} - 10^{-2} M zugesetzt. Die Wirkung von Aceton, Methanol, Äthanol und Glycerin wurde bei einem Gehalt der Enzymlösung von 1-10% geprüft. Der Tetracaingehalt lag zwischen 0,1 und 3,0 mM. Die spezifische Aktivität der mit den aufgeführten Substanzen inkubierten Extrakte wurde in bestimmten zeitlichen Abständen gemessen.

3.2.6 Methodik der Versuche zur Anreicherung der B-OHDD

3.2.6.1 QAE-Sephadex-A 50-Säulenchromatographie

Zur Verhinderung eines randlichen Schmierens der Säulen wurden sie vor Benutzung mit Chromschwefelsäure, Kaliumpermanganatlösung und Natronlauge gereinigt.

Vorbereitung des Ionenaustauschers:

QAE-Sephadex-A 50 wurde durch Schütteln in 0,05 M Kaliumphosphat-/0,05 M Kaliumcarbonat-/0,005 M Thioglycerinpuffer pH 9,5 und mehrmaliges Dekantieren des Puffers gewaschen und vorgequollen. Eine vollständige Äquilibration wurde durch 2-3-tägiges Stehenlassen des aufgeschlämmten Gels erreicht. Nach Eingießen in die Säule und anschließender langsamer Sedimentation wurde mit mehreren Säulenvolumina des gleichen Puffers nachgewaschen.

Durch Titration mit 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung wurde der pH-Wert im Ausgangsextrakt von 10,5 auf 9,5 gesenkt. Anschließend wurde mit vorgekühltem bidestillierten Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt. Die erhaltene 0,05 M Lösung wurde auf die Säule aufgetragen. Das Protein eluierten wir mit Extraktionspuffer (0,05 M) durch stufenweise Erhöhung des KCl-Gehaltes von 0,1 auf 0,2; 0,5 M. Das Eluat wurde in 2 ml-Fractionen mit einem LKB-Ultro-Rac Fraktionensammler (LKB Producter AB, Bromma, Schweden) aufgefangen.

3.2.6.2 Isoelektrische Focussierung

Die Versuche wurden in einer 110 ml-LKB-Säule mit Doppelkühlmantel durchgeführt. Bei Bereitung des Gradienten wurden die nach Schaeg et al (34) veränderten Saccharosekonzentrationen einer Vorschrift von Delmotte (35) verwendet.

Die Lösungen wurden im Gradientenmischer sowohl während des Überschichtens als auch während des Einlaufs in die Focussiersäule gekühlt. Für die Trennung wurde Ampholine pH 3-10 verwendet. Bei der Elektrodenlösung handelte es sich um Äthylen-diamin. Die Aktivität enthaltende Lösung muß salzfrei in die Säule gebracht werden. Deshalb wurde der alkalische Extrakt nach Zusatz von Lensodel NP 40 bis zu einer Konzentration von 0,1% 4 Stunden gegen 0,1% Lensodellösung dialysiert. Die angelegte Spannung wurde nach Beginn der Focussierung etwa 4-5 Mal nachgeregelt, bis sie sich auf einen nahezu konstanten Wert einstellte. Das Eluat wurde in 1,6 ml-Frak-tionen gesammelt, (Fraktionensammler LKB) die nach Erhalt sofort gekühlt wurden.

3.2.6.3 Sepharose 2B und 6B- Säule

Nach Auswaschen des in Sepharose enthaltenen Bakteriostati-kums (Natriumazid) mit destilliertem Wasser wurde das Gel in 0,06 M Tris-Cl/0,2 M Thiopuffer pH 8,1 äquilibrirt.

Das Protein wurde erst nach Präinkubation aufgetragen.

Eluiert wurde mit 0,06 M Tris-Cl-/0,2 M Thiopuffer pH 8,1.

Die Aktivität der aus der Säule eluierten 2,5 ml-Frak-tionen konnte deshalb unmittelbar gemessen werden.

3.2.7 Analytische Untersuchungen des alkalischen Extrakts

3.2.7.1 Untersuchungen des alkalischen Extrakts mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge

Der alkalische Extrakt wurde in 2 Chargen geteilt, von denen eine unmittelbar nach Solubilisierung in der analytischen Ultrazentrifuge (Heraeus-Christ; Omega II/70 mit analytischem Zusatz) untersucht wurde. Die Zentrifugation der zweiten Charge wurde 24 Stunden später durchgeführt. Während der beiden Läufe wurde jeweils gleichzeitig die spez. Akt. bestimmt. Die bei 260.000 g durchgeführten Zentrifugationen des Proteins wurden mit Hilfe einer auf die Schlierenoptik aufgesetzten Kamera verfolgt.

3.2.7.2 Gelchromatographie und SDS-Gelchromatographie

Sephadex G-150, G-200 sowie Sepharose 6B wurden durch dreitägige Quellung in Extraktionspuffer (pH 7,4) äquilibriert. Im Fall der Chromatographie des mit SDS vorbehandelten Materials wurde 0,05 M Tris-Cl-Puffer verwendet, der zusätzlich 0,1% Thiol und 0,1% SDS enthielt.

Präparation der Substanzlösungen: Der pH der detergenzfreien Enzymlösung wurde vor dem Auftragen durch Titration mit 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat auf pH 7,4 gesenkt.

Für die SDS-Gelchromatographie wurde der Extrakt nach Dialyse gegen 0,05 M Tris-Cl-Puffer pH 7,4 bis zu einer Konzentration von 0,1% mit SDS versetzt und anschließend 3 - 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Aufgetragen wurde das 6 Stunden gegen Säulenpuffer dialysierte Material. (Säulenpuffer 0,05 M Tris-Cl; 0,1% SDS; 0,1% Thiol). Bei allen Gelarten betrug das Säulenvolumen jeweils 150 ml, bei einem Säulendurchmesser von 2 cm.

Durch Regelung des hydrostatischen Drucks (Variation der Höhendifferenz zwischen Flüssigkeitsspiegel und Auslaufschlauch) konnte bei allen Gelen eine genügend hohe Durchflußrate erreicht werden.

3.2.7.3 Diskelektrophoretische Untersuchungen

Die Trennungen erfolgten mit Hilfe des bei Maurer (36) beschriebenen 7,5% Mittelporgels (Gelsystem Nr. 1, 36), sowie nach der Vorschrift von Glossmann und Lutz (37) auf einem 10% Gel. Das zur Polymerisation notwendige Peroxid brauchte, wie entsprechende Versuche ergeben hatten, nicht ausgewaschen zu werden, da die von Brewer (38) beschriebenen Artefakte hier nicht auftraten.

Bereitung der Gele:

Die Mischung aus den Komponenten wurde entgast und in Disk-Röhrchen gefüllt, (Innendurchmesser: 0,6 cm; Länge: 6,5 cm) und mit Wasser überschichtet. Nach 35-40-minütiger Polymerisation im UV-Licht wurde das Wasser dekantiert und mit Elektrodenpuffer nachgewaschen. Auf diesem Mittelporgel wurde in gleicher Weise ein etwa 0,5 cm hohes Sammelgel polymerisiert. Für die Untersuchung des Ausgangsextraktes sowie bei der SDS-Elektrophorese konnte auf das Sammelgel verzichtet werden, da ohne dieses Gel die gleichen Auftrennungen erzielt wurden.

Präparation der Proben:

Aufgetragen wurden zwischen 50 und 250 μ g Protein, die in Volumina zwischen 50 und 200 μ l enthalten waren. Bei dem Eluat der Sephadex-Säulen war zum Teil eine Konzentrierung durch Druckdialyse vorangegangen (PM-30 Membran von Amicon), um zu ausreichend hohen Proteinkonzentrationen zu kommen.

Bei der SDS-Diskelektrophorese nach Glossmann (37) wurden zu der Enzympräparation (pH 7,4) 0,1% Thioglycerin (V/V) und 1% Dodecylsulfat (G/V) zugegeben. Anschließend wurde 5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die erhaltene klare Lösung wurde gegen 0,01 M Phosphat-/0,1% Thioglycerin-/0,1% SDS-Puffer dialysiert.

Der Proteinlösung wurde bei allen elektrophoretischen Trennungen vor dem Auftragen auf das Gel je ml 0,34 g Saccharose zugesetzt. Die Trennungen wurden mit einer Ausrüstung der Firma Canal Industry Co., Rockville, USA durchgeführt. Während der ersten 5 Minuten nach Beginn der Elektrophorese wurde die Stromstärke auf 1 mA/Gel eingestellt. Danach wurde sie auf 5 mA/Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande das Gelende (in Richtung Anode) erreicht hatte. Die Färbung wurde nach Maurer (36) mit Amidoschwarz 10 B oder nach Weber und Osborn (39) mit Coomassie Brilliant Blue durchgeführt. Die Färbedauer betrug für Amidoschwarz 12 Stunden, für Coomassie 2 Stunden. Die Gele wurden elektrophoretisch entfärbt.

3.2.8 Versuch zur Dissoziation der Proteinkomponenten

3.2.8.1 Chaotrope Ionen

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte nach Hatefi et al (40). Dabei wurde der mit 0,1 M KH_2PO_4 auf pH 7,4 titrierte Extrakt mit verschiedenen Konzentrationen an Guanidiniumchlorid, Harnstoff sowie NaSCN und NaClO_4 (1-6 M) zwischen 30 Minuten und 6 Stunden sowohl bei 0°C als auch bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden unmittelbar nach Zusatz der entsprechenden Substanzen sowie nach anschließender Dialyse auf ihre Aktivität untersucht.

Als Dialysepuffer wurde 0,1 M KH_2PO_4 -/0,1 M K_2CO_3 -/0,01 M Thioglycerinlösung verwendet. (pH 7,5 und 10,3)

3.2.8.2 Enzymatischer Aufschluß

Der alkalische Extrakt wurde mit 0,1 M KH_2PO_4 auf die pH-Optima der einzelnen Proteasen titriert. Pro 10 mg Protein wurden 0,6 mg Trypsin; 1,3 mg Papain; 0,2 mg α -Protease zugesetzt. Im Falle der Inkubation mit Protease war der Ansatz vor Zugabe des Enzyms 4 Stunden lang gegen 0,05 M Tris-Cl-Puffer pH 8,9 dialysiert worden. Die Aktivität dieses Enzyms wurde mit der bei Zwilling und Pfeleiderer (41) angegebenen Methode gemessen.

3.2.8.3 Aufschluß mit Detergentien

Der Aufschluß mit Glycerin bzw. Äthylenglykol und dessen Polymerisaten wurde nach der Methode von Krisch (42) durchgeführt. Die Ansätze enthielten zwischen 1% und 10% Glycerin bzw. Äthylenglykol verschiedenen Polymerisationsgrades. Sie wurden 20 Stunden lang bei 0°C unter ständigem Rühren inkubiert. Die nichtionischen sowie ionischen Detergentien waren bis zu Konzentrationen zwischen 0,1% und 1% zu den Ansätzen gegeben worden. Bei Inkubation mit Natriumdodecylsulfat mußte der Extrakt zuvor gegen Kalium-freien Puffer dialysiert werden, um ein Ausfallen des Kaliumsalzes von Dodecylsulfat zu verhindern. Zur Dialyse wurde 0,1 M Tris-Cl-Puffer pH 8,1 verwendet. Die Ansätze mit nichtionischem Detergenz wurden bei 0°C, die mit ionischem Detergenz bei 0°C und Zimmertemperatur inkubiert. Der Gehalt an tert. Amylalkohol lag bei 10%, der von Äthanol zwischen 10% und 50%. Die spezifische Aktivität der Proben wurde unmittelbar nach der Zugabe des Detergenz bzw. Alkohols sowie nach 16-20-stündiger Inkubation gemessen.

4.0 Ergebnisse

4.1 Zur Frage der Stabilität der solubilisierten β -OHDH

Die Enzympräparation von Gotterer (18) zeigt eine zeitlich abnehmende Reaktivierbarkeit. Eine gewisse Stabilisierung wird erreicht, wenn man deren pH-Wert senkt. Die nach Präinkubation des 24 Stunden bei pH 7,2 - 7,5 und 0°C aufbewahrten Extrakts erhaltene Aktivität liegt zwischen 60 und 70% des Ausgangswertes und ist damit doppelt so hoch wie die des pH 10,0 - 10,5-Extraktes.

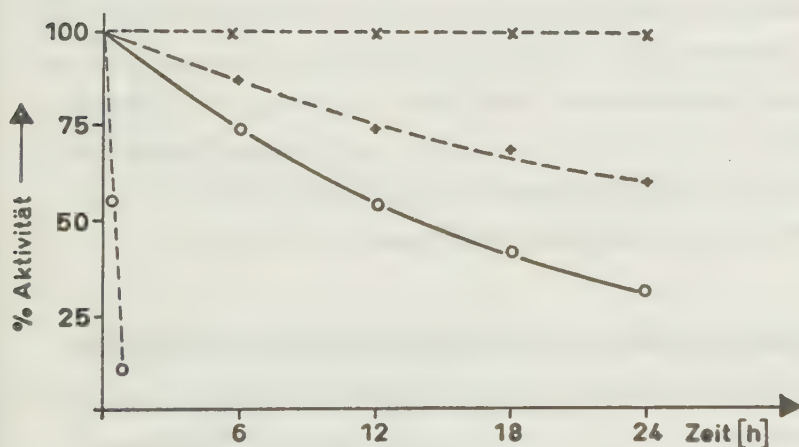


Abb. 1 Reaktivierbarkeit der β -OHDH nach alkalischer Extraktion in Prozent der unmittelbar nach Solubilisierung erhaltenen Ausgangsaktivität

—○—○— Alkalischer Extrakt pH 10,0-10,5 Inkubationstemperatur 0°C
 —+—+— " " " 7,2-7,5 " 0°C
 --○--○-- " " " 10,0-10,5 " 22°C
 --x--x-- Aktivität des unmittelbar nach alkalischer Solubilisierung präinkubierten Extrakts

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1;

T: 25°C; Protein: 0,3 mg / 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,5 mg Protein; 20 mM Tris-/Phosphat-/Carbonatpuffer
pH 8,1; 4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,45 mg PC in
zusammen 0,5 ml

Nahezu vollständig erhalten bleibt die Aktivität nach sofortiger Reaktivierung des Extrakts mit PC. Durch Anwesenheit von mono- und bivalenten Kationen, reduzierenden Substanzen, organischen Lösungsmitteln sowie EDTA, Substrat und Cosubstrat, Tetracain (s. 3.2.5) wird bei pH 7,2-7,4 keine zusätzlich stabilisierende Wirkung erzielt. Die Instabilität ist nicht auf Kälteinaktivierung zurückzuführen.

4.1.1 Untersuchung der Bindungsart des Protein-PC-Komplexes

Durch Reaktivierung der β -OHDH in Gegenwart verschiedener KCl-Konzentrationen wollten wir Aufschluß über die Bindungsart des Protein-PC-Komplexes erhalten.

Selbst bei Zusatz von KCl bis zu Konzentrationen von 1 M lassen sich- wie aus Abb. 2 ersichtlich- noch 60% der Aktivität erreichen, die man ohne KCl im Präinkubationsansatz erzielt. Zu den gleichen Ergebnissen kommt man, wenn der aktive Protein-PC-Komplex unter entsprechenden Bedingungen inkubiert wird.

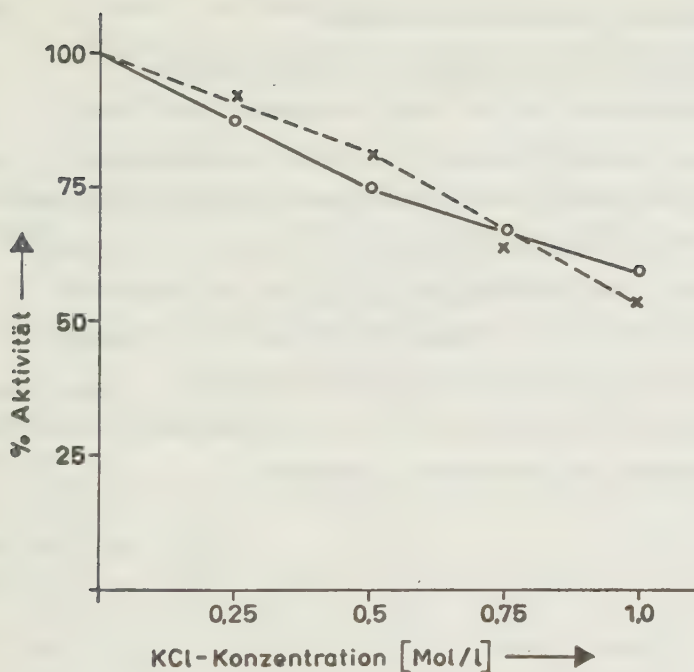


Abb. 2 Die Einwirkung verschiedener KCl-Konzentrationen während und nach Reaktivierung auf die Aktivität des Enzyms

--x--x KCl anwesend bei Reaktivierung

—o—o KCl zugegeben zum aktiven Protein-PC-Komplex

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1;

T: 25°C; Protein 0,35 mg / 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,57 mg Protein; 20 mM Tris-/Phosphat-/Carbonat-puffer pH 8,1; 4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin;

0,450 mg PC in zusammen 0,5 ml

4.2 Versuche zur Isolierung der β -OHDH

4.2.1 Versuche zur Anreicherung durch Säurefällung

Als Ausgangsmaterial für die Anreicherungsversuche durch Säurefällung diente der bei pH 10,3 gewonnene alkalische Extrakt. Dieser wurde mit 2,5 M Essigsäure bis zu den in der folgenden Tabelle angegebenen pH-Werten titriert. Die jeweils entstandenen Suspensionen wurden 20 Minuten bei 105.000 g zentrifugiert. Sowohl der Überstand als auch das Sediment wurden auf ihre spezifische Aktivität untersucht.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten läßt keine merkliche Abtrennung von Fremdprotein erkennen.

Tab. 1 Vergleich der spezifischen Aktivitäten der β -OHDH
in den durch Säurefällung erhaltenen Fraktionen:

Reinigungs- schritt	Fraktion	Spez. Aktivität für die β -OHDH (μ Mol BOH red. mg Prot. $^{-1}$ min $^{-1}$)	Anreicherungs- faktor	Aus- beute
Alkalischer Extr. bei pH 10,3	Alk. Ex- trakt	0,8	1	100%
Säurefällung pH 6,9	U ⁺)	0,75	0,94	
	S ⁺⁺)	0,9	1,1	30-35%
Säurefällung pH 5,9	U	0,75	0,94	
	S	0,80	1,0	15-20%
Säurefällung pH 4,9	U	—	—	—
	S	0,75	0,94	15-20%

+) = Überstand

++) = Sediment

Bedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C; Pro-
tein: 0,24 - 0,30 mg / 2 ml Ansatz

Präinkubationsbedingungen:

0,4 - 0,5 mg Protein; 20 mM Tris-Phosphat-Carbonatpuffer pH 8,1;
4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,450 mg PC in zusammen 0,5 ml

4.2.2 Chromatographie des alkalischen Extrakts an QAE-Sephadex-A 50

Die Elution des Proteins wurde mit einem diskontinuierlichen KCl-Gradienten durchgeführt, da entsprechende Versuche ergeben hatten, daß bei Anwendung eines linearen Gradienten die Inaktivierung des Extrakts zu weit fortschreitet (s. 4.1). Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nur für den Teil der Fraktionen, in dem die Proteinkonzentration nahezu konstant war, weil lediglich hier- hinsichtlich des PC-Proteinverhältnisses- annähernd gleiche Präinkubationsbedingungen gegeben waren.

Da diese Fraktionen zudem gleichzeitig präinkubiert wurden und damit eine unterschiedliche Inaktivierung ausgeschlossen werden kann, muß der Abfall der spezifischen Aktivitäten so gedeutet werden, daß mit zunehmenden Elutionsvolumen mehr Fremdprotein eluiert wurde.

Die höchsten Werte für die spezifische Aktivität des Eluats liegen trotz Inaktivierung während des Versuchs etwas über dem des Ausgangsextraktes. (Eluat: $1,4 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; Ausgangsextrakt: $1,1 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Aus der PC-Sättigungskurve für das Apoenzym (Gotterer, 18) geht hervor, daß bei einem PC: Proteinverhältnis von 1:1 (G/G) in etwa halbmaximale Reaktivierung erreicht wird. Die größere spez. Aktivität des Eluats kann allein auf das gegenüber dem Ausgangsextrakt erhöhte PC: Proteinverhältnis während der Präinkubation zurückgeführt werden.

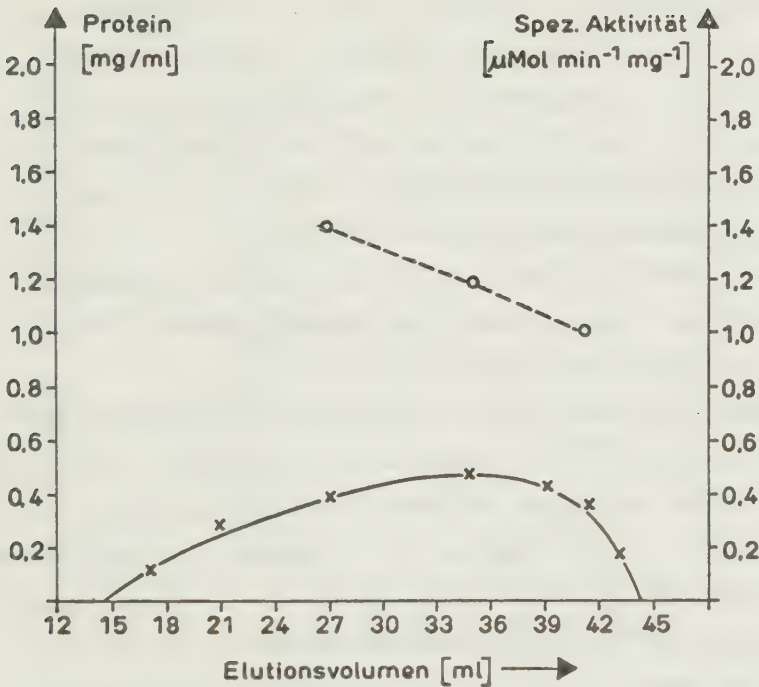


Abb. 3 Elutionsdiagramm des Apoenzym enthaltenden Extrakts an einer QAE-Sephadex A 50-Säule

Aufgetragen: 20 mg Protein

-x-x-x- Protein

-o-o-o- Spezifische Aktivität

Reaktionsbedingungen für den Enzymtest:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C;

Protein: 0,06 ml Eluat / 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,1 ml Eluat; 20 mM Tris-Kaliumphosphat-/Kaliumcarbonatpuffer pH 8,1; 4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,45 mg PC in einem Ansatz von 0,5 ml

4.2.3 Elektrofocussierung des Apoenzyms

Der alkalische Extrakt wurde ohne vorherige Reduzierung des pH wie unter 3.2.6.2 beschrieben dialysiert. Von diesem Extrakt wurden 18 ml, die insgesamt 10 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität von $0,95 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ enthielten, aufgetragen. Nach 20-stündiger Focussierdauer wurde mit Erreichen einer konstanten Spannung und Stromstärke eluiert.

Das Protein wurde auf der Säule in zwei deutlich voneinander unterscheidbare Zonen getrennt. Die Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen bestätigte dieses Bild.

Die Messung der pH-Werte für die Isoelektrischen Punkte ergab für den Proteinpeak A bei laufendem ml 31 einen Wert von 6,8, für den Proteinpeak B, mit maximaler Proteinkonzentration bei laufendem ml 60, einen Wert von 5,4. In beiden Fraktionen konnte nach Präinkubation Aktivität gemessen werden. Die Werte lagen bei $0,6 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für Peak A und $0,4 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für Peak B. Die Ausgangsaktivität ist aufgrund der Verminderung der Reaktivierbarkeit (s. 4.1) in keiner der beiden Fraktionen erreicht worden. Im Eluat wurden etwa 75% der ursprünglich aufgetragenen Proteinmenge wiedergefunden.

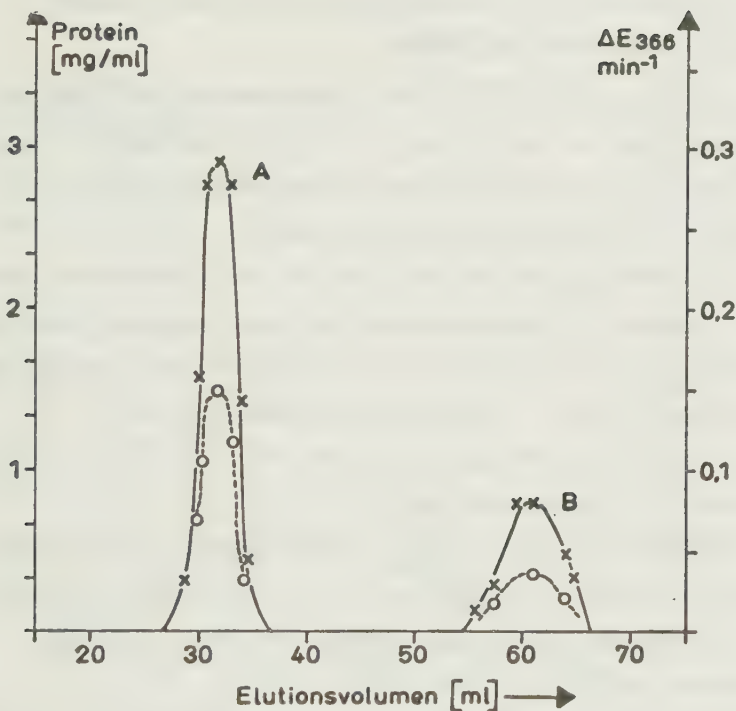


Abb. 4 Mit Hilfe der Elektrofocussierung erhaltenes Elutionsdiagramm einer Apoenzym enthaltenden Lösung

—x—x— Proteingehalt

o---o---o Aktivität der β -OHDH

Reaktionsbedingungen für den Enzymtest:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C;

Protein: 0,06 ml Eluat in zusammen 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,1 ml Eluat; 20 mM Tris-/Phosphat-/Carbonatpuffer pH 8,1;

4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,45 mg PC in zusammen 0,5 ml

4.2.4 Versuch einer Anreicherung des mit PC reaktivierten Apoenzyms über Sepharose-Säulen

Eine Anreicherung der β -OHDH nach Reaktivierung wäre dann zu erreichen, wenn mit der Bildung des PC-Protein-Komplexes eine spezifische Bindung zwischen dem aktiven Protein und PC unter Abspaltung von Fremdprotein erfolgen würde.

Ob eine Aufspaltung des Proteins während der Präinkubation auftritt, wurde durch Chromatographie von reaktiviertem Material an Sepharose 2B und 6B geprüft. Die Gelbettvolumina beider Säulen betrugen 150 ml. (Durchmesser der Säule: 2 cm).

Aufgetragen wurden jeweils 5 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität von $0,9 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Die Bestimmung von Protein sowie Lecithin-Phosphor wurde nach Dialyse der einzelnen Fraktionen gegen 0,06 M Tris-Cl-Puffer pH 8,1 durchgeführt, um eine Störung durch Thiol und anorganisches Phosphat zu vermeiden.

Eine Proteinbilanz der einzelnen Fraktionen ergab, daß auf der 2B-Säule 60%, auf der 6B-Säule 70% des aufgetragenen Proteins wiedergefunden wurden. Die Ausbeute bei den Gesamtaktivitäten differierte dagegen sehr stark. Sie betrug für die 2B-Säule 80%, für die 6B-Säule nur 30%. Auf beiden Säulen wird das Protein in einem einzigen nahezu symmetrischen Peak eluiert. Eine Abtrennung von Fremdprotein wird nicht beobachtet. Alle Fraktionen der 2B-Säule besitzen in etwa gleiche spezifische Aktivität. Für die 6B-Säule ist mit zunehmendem Elutionsvolumen ein Absinken der spezifischen Aktivität festzustellen. Die Relationen PC : Protein in den einzelnen Fraktionen der 2B- und 6B-Säule sind in den Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

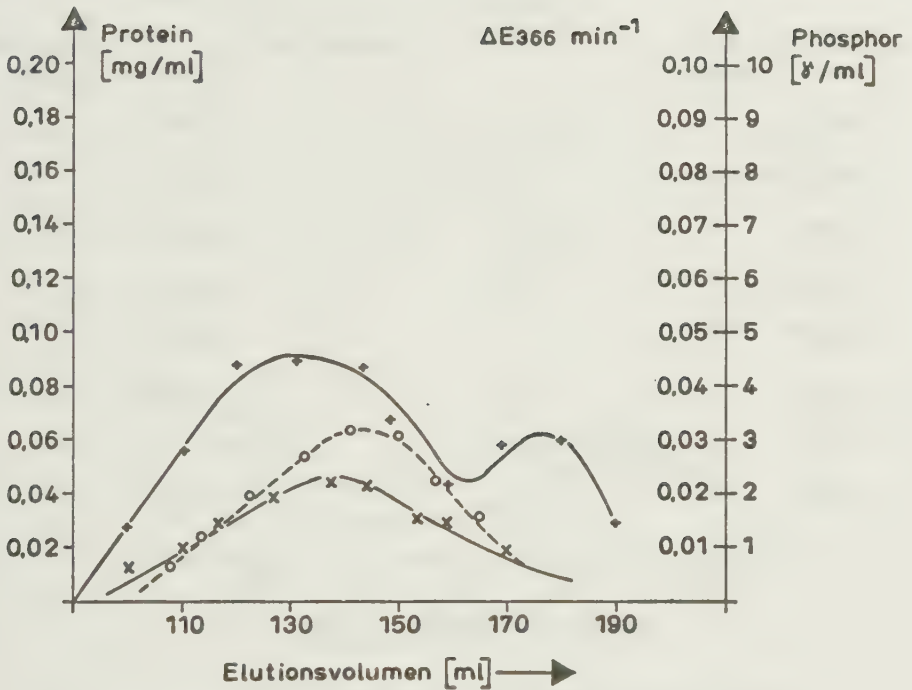


Abb. 5 Chromatographie von reaktiviertem Extrakt an einer Sepharose 2B-Säule

- x—x— Proteingehalt
- o--o-- Aktivität der β -OHDH
- +—+— Phosphorgehalt nach Dialyse

Reaktionsbedingungen für den Enzymtest:

1mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C;
 Protein: 0,5 ml Eluat / 2 ml Ansatz

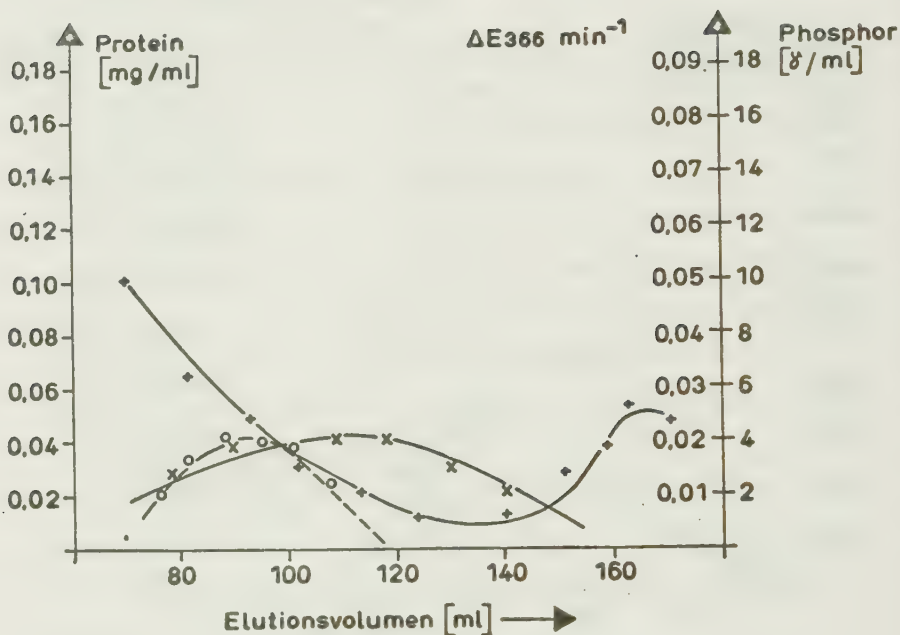


Abb. 6 Chromatographie von reaktiviertem Extrakt an einer Sepharose 6B-Säule

- x—x— Proteingehalt
- o--o-- Aktivität der β -OHDH
- +—+— Phosphorgehalt nach Dialyse

Reaktionsbedingungen für den Enzymtest:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C;
 Protein: 0,5 ml Eluat in zusammen 2 ml Ansatz

Tab. 2 Das PC : Proteinverhältnis in den einzelnen
Fraktionen der Sepharose 2B-Säule

lauf. ml.	Protein (mg/ml)	PC (mg/ml)	PC : Protein
104,9	0,015	0,042	2,8
109,2	0,020	0,070	3,5
115,2	0,030	0,080	2,7
120,9	0,035	0,100	2,8
126,3	0,040	0,110	2,7
131,6	0,040	0,110	2,7
137,0	0,050	0,115	2,2
142,3	0,040	0,121	3,0
147,6	0,030	0,082	2,7

Protein- und Phosphorbestimmung siehe Text

Tab. 3 Das PC : Proteinverhältnis in den einzelnen
Fraktionen der Sepharose 6B-Säule

lauf. ml.	Protein (mg/ml)	PC (mg/ml)	PC : Protein
70,7	0,023	0,260	11,4
76,1	0,025	0,200	8,0
81,4	0,035	0,150	4,2
86,7	0,045	0,135	3,0
92,0	0,043	0,115	2,8
97,3	0,040	0,110	2,8
102,6	0,040	0,065	1,6
107,9	0,040	0,065	1,6
112,2	0,040	0,050	1,2

Protein- und Phosphorbestimmung siehe Text

4.3 Analytische Untersuchungen an dem nach alkalischer Extraktion von Mitochondrienfragmenten erhaltenen Extrakt

4.3.1 Untersuchungen des alkalischen Extrakts mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge

Durch Sedimentationsanalyse sollte die Molekulargewichtsverteilung der im Extrakt enthaltenen Proteine geprüft werden. Dazu wurde wie unter 3.2.7.1 beschrieben vorgegangen.

Wie Bild 1 zeigt, ist bereits mit Erreichen der Höchstgeschwindigkeit von 60.000 UpM ($\approx$ 260.000 g) ein rasch wandernder Peak auszumachen.

5 - 10 Minuten danach beginnt die Ablösung eines weiteren Peaks. Eine vollständige Sedimentation dieses Proteins, das inhomogen zu sein scheint, ist auch nach 55-minütiger Zentrifugation nicht erreichbar (Bild 2). Wahrscheinlich liegen 2 Proteinkomponenten in etwa gleicher Konzentration vor.

Wie ein Flächenvergleich aus mehreren Läufen ergab, liegt der Anteil der schnell sedimentierenden Komponente am Gesamtprotein zwischen 2% und 15%. (In den meisten Fällen lag er unter 5%). Das Molekulargewicht des schnell sedimentierenden Proteins ist mit 800.000, das der langsam sedimentierenden Komponenten mit 30.000 berechnet worden. Aufgrund der wahrscheinlich niedrigen spezifischen Dichte der lipidhaltigen Proteinkomponenten kann vor allem der zweite Wert stark von dem tatsächlichen Molekulargewicht abweichen. Bei der schnell sedimentierenden Proteinbande handelt es sich möglicherweise um Mitochondrienfragmente, die beim Abkippen des Extrakts nach Zentrifugation mitgeschleppt werden. Für diese Vermutung spricht vor allem, daß der Anteil am Gesamtprotein stark schwankt.



- Bild 1 Sedimentation von alkalischem Extrakt

Zeit: Erreichen der Höchstgeschwindigkeit von 60.000 UpM

Winkel: 30° ; Proteingehalt: 5 mg/ml; Ausgangsaktivität: $0,8 \mu\text{Mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

T: $0 - 4^{\circ}\text{C}$



Bild 2 Sedimentation von alkalischem Extrakt

Zeit: 55 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit

Winkel: 40° ; Proteingehalt: 5 mg/ml; Aktivität: $0,8 \mu\text{Mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

Temperatur: $0 - 4^{\circ}\text{C}$

4.3.1.1 Korrelation des Sedimentationsverhaltens des alkalischen Extrakts mit dessen zeitlich abnehmender Reaktivierbarkeit

Die Sedimentation der Proteinkomponenten des alkalischen Extrakts wurde unmittelbar nach dessen Gewinnung (4.3.1) sowie nach 24-stündiger Inkubation bei 0°C untersucht. Die spez. Akt. des Enzyms im Extrakt wurde vor Beginn des Zentrifugenlaufs bestimmt. Wie Bild 2 zeigt, ist in dem unmittelbar nach Gewinnung zentrifugierten Extrakt die Inhomogenität des zweiten Peaks 55 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit feststellbar. In dem 24 Stunden bei 0°C und pH 10,5 inkubierten Extrakt wird nach entsprechender Zentrifugationsdauer ein ganz ähnliches Bild erhalten (Bild 3, 4). Diese Ähnlichkeit im Sedimentationsverhalten der unterschiedlich aktiven Extrakte macht eine Aggregation bzw. Dissoziation des Proteins als Ursache für eine Inaktivierung unwahrscheinlich.

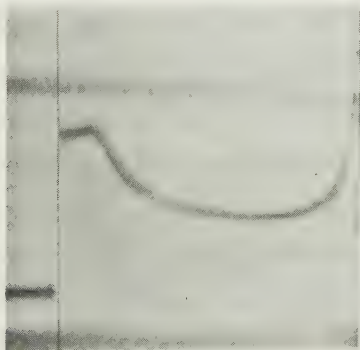


Bild 3 Sedimentation von 24 Stunden inkubierten alk. Extrakt
Zeit: 55 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit
Proteingehalt: 5 mg/ml; Aktivität: $0,3 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; T: 0-4°C;
Aufnahmewinkel: 40°

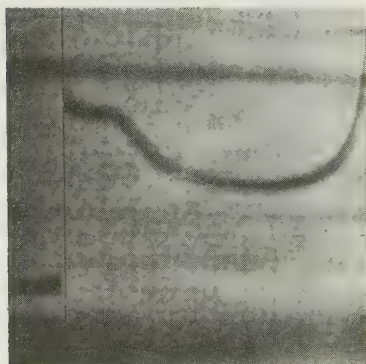


Bild 4 Sedimentation von 24 Stunden inkubiertem alk. Extrakt

Zeit: 65 Minuten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit

Proteingehalt: 5 mg/ml; Aktivität $0,3 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Temperatur: $0 - 4^{\circ}\text{C}$; Aufnahmewinkel: 35°

4.3.2 Gelchromatographische Untersuchungen des Extrakts

4.3.2.1 Gelfiltration des Extrakts mit Hilfe von Sephadex G-150, G-200 sowie mit Hilfe von Sepharose 6B

Zu weiteren analytischen Untersuchungen wurde der das Apoenzym enthaltende Extrakt auf Gelen verschiedener Trennbereiche chromatographiert. Bei eventuell auftretender Trennung sollte die Proteinzusammensetzung aller Fraktionen, die reaktiviert werden konnten, diskelektrophoretisch festgestellt werden.

Auf der Sephadex G-150-Säule wurde das gesamte Protein ausgeschlossen und daher weitgehend unverdünnt eluiert. Das Protein konnte hier ohne vorherige Konzentrierung reaktiviert werden. Die im Eluat gemessene spezifische Aktivität erreichte 80% des Ausgangswertes.

Bei Chromatographie an Sephadex G-200 wird die Hälfte bis ein Drittel des Proteins ausgeschlossen, während der Rest im Trennbereich des Gels läuft; auf Sepharose 6B läuft das gesamte Protein im Trennbereich.

Nach den bei Determann (43) und der Firma Pharmacia (44) angegebenen Ausschlussgrenzen für Sephadex- und Sepharose-Gele kann damit die kleinere der beiden Komponenten vom Molekulargewicht her auf einen Wert zwischen 400.000 und 800.000 eingegrenzt werden, die größere auf einen Wert zwischen 800.000 und 4.000.000. Das Exklusionsvolumen, das mit Dextranblau bestimmt wurde, lag für alle drei Säulen bei etwa 65 ml.

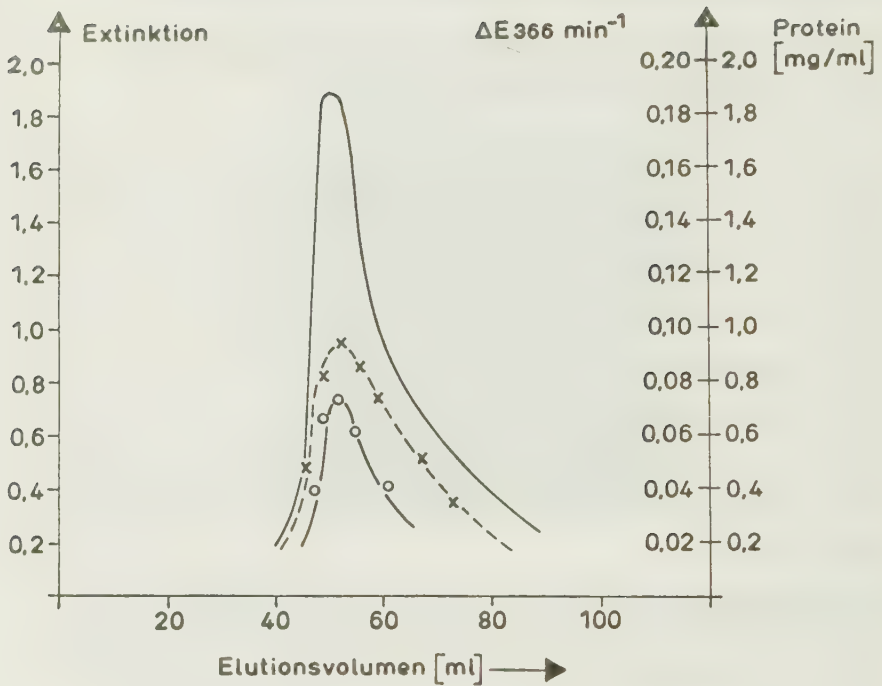


Abb. 7 Chromatographie des Apoenzym enthaltenden Extrakts an einer Sephadex G-150-Säule

————— Extinktion bei 280 nm
 ---x---x--- Proteingehalt
 —o—o— ΔE/min

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris-Cl-Puffer pH 8,1; T: 25°C;
 Proteinmenge: 0,06 ml Eluat / 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,1 ml Eluat; 20 mM Tris-/Phosphat-/Carbonatpuffer pH 8,1;
 4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,45 mg PC in zusammen 0,5 ml

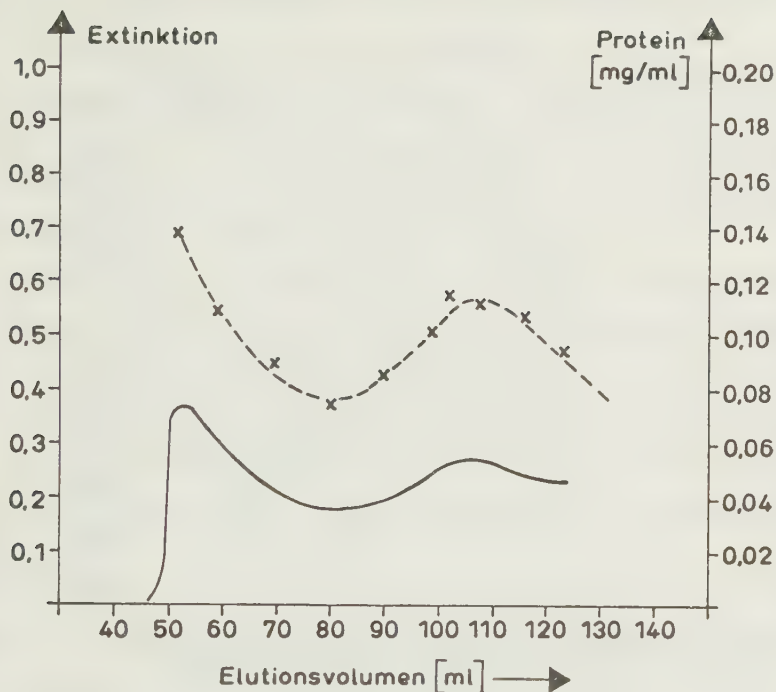


Abb. 8 Chromatographie des Apoenzym enthaltenden Extrakts
an einer Sephadex G-200-Säule

———— Extinktion des Eluats bei 280 nm
---x---x--- Proteingehalt

Aufgetragen: 8 mg Protein

Im Bereich beider Proteinpeaks wurde Aktivität gemessen; die erreichten Werte ($\Delta E/min$) waren jedoch aufgrund der großen Verdünnung durch die Säule nicht genau bestimmbar.

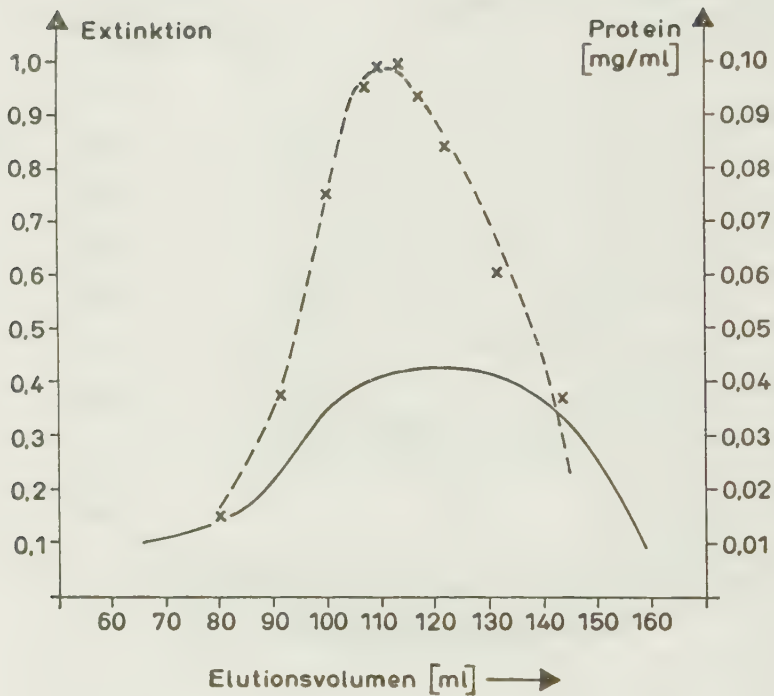


Abb. 9 Chromatographie von Apoenzym enthaltendem Extrakt
an einer Sepharose 6B-Säule

———— Extinktion des Eluats bei 280 nm

---x---x--- Proteingehalt

Aufgetragen: 9 mg Protein

Die Messung der spezifischen Aktivität des Eluats erfolgte
nach Druckdialyse.

4.3.2.2 Gelfiltration des mit SDS vorbehandelten Extrakts

Durch diesen Versuch sollte ermittelt werden, ob das im Extrakt enthaltene Protein nach Behandlung mit SDS präparativ trennbar ist. Damit sollte die Voraussetzung für eine eventuell mögliche Reaktivierung kleinerer Proteineinheiten als der im Ausgangsextrakt vorhandenen geschaffen werden.

Die Methodik dieses Versuchs ist unter 3.2.7.2 beschrieben. Nach einer Kalibrierung der Säule mit Eichproteinen (Rinder-serumalbumin, Trypsin, Cytochrom c) wurden 1,5 ml des mit SDS behandelten Extrakts mit insgesamt 15 mg Protein aufgetragen. Die Proteinbestimmung im Eluat erfolgte nachdem die einzelnen Fraktionen gegen 0,05 M Tris-Cl-Puffer pH 8,1 dialysiert worden waren.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, ist das Elutionsvolumen der Proteine des SDS- behandelten Extrakts größer als das von Rinder-serumalbumin (MG: 65.000) und kleiner als das von Trypsin (MG: 24.000) und Cytochrom c (MG: 11.600) . Aus diesem chromatographischen Verhalten kann abgeleitet werden, daß SDS das Molekulargewicht des in der Enzympräparation enthaltenen Proteins beträchtlich herabsetzt. Es liegt unter einem Wert von 65.000.

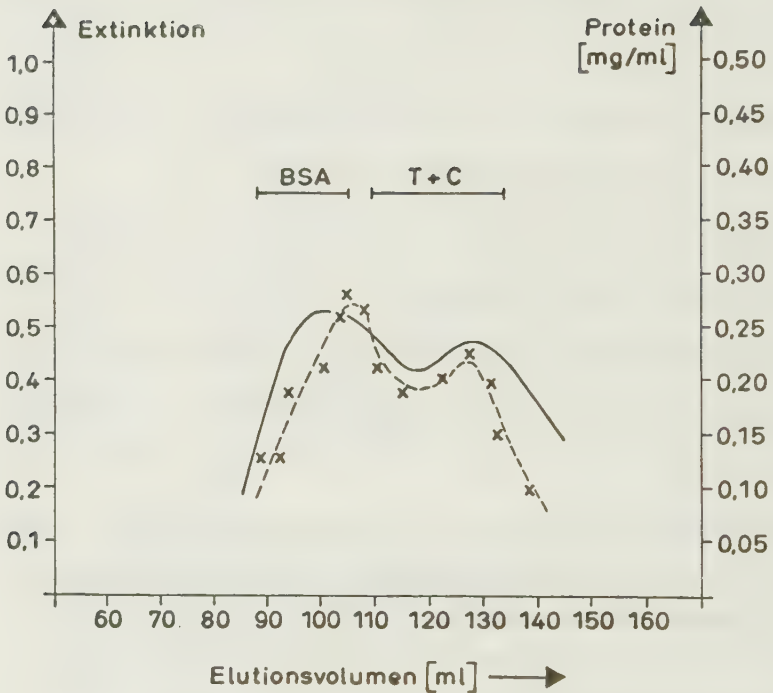


Abb. 10 Elutionsdiagramm von Apoenzym enthaltendem Extrakt nach Behandlung mit SDS

- | | |
|-------------|--|
| ————— | Extinktion des Apoenzym enth. Extrakts bei 280 nm |
| ---x---x--- | Protein (SDS-Apoenzym) |
| <u>BSA</u> | Elutionsbereich von Rinderserumalbumin (Spektralphotometrisch ermittelt bei 280 nm) |
| <u>T+C</u> | Elutionsbereich von Trypsin und Cotochrom c (Spektralphotometrisch ermittelt bei 280 nm) |

4.3.3 Diskelektrophoretische Untersuchungen des mit SDS
vorbehandelten sowie nicht vorbehandelten Extrakts

Zur Vervollständigung der analytischen Untersuchungen wurde
der Extrakt auf Mittel- und Kleinporgel diskelektrophoretisch
untersucht. Die Methodik hierzu ist unter 3.2.7.3 beschrieben.

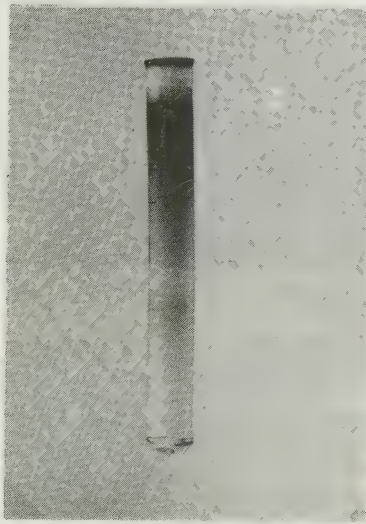


Bild 5 Diskelektrophoretische Trennung des alkalischen
Extrakts auf Mittelporgel

Aufgetragen: 0,05 ml $\hat{=}$ 0,05 mg Protein

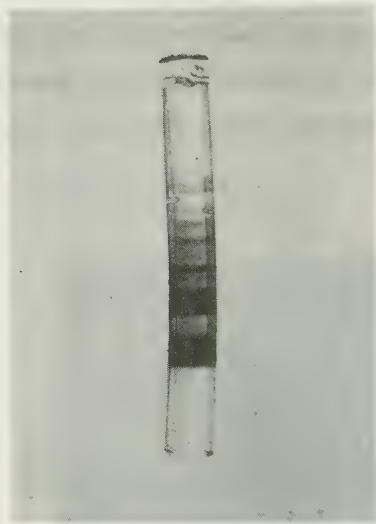
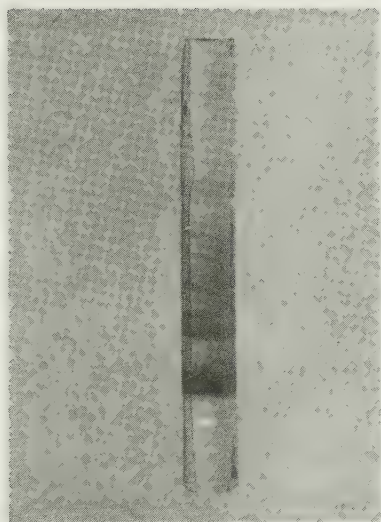


Bild 6 Diskelektrophoretische Trennung von Apoenzym enthaltendem Extrakt nach Behandlung mit SDS (3.2.7.3) auf einem 10% Gel

Aufgetragen: 0,05 ml $\hat{=}$ 0,1 mg

4.3.3.1 SDS-Gelelektrophorese der beiden Proteinpeaks aus der Sephadex G-200-Säule

Die Fraktionen vom laufenden ml 50 - 65 sowie vom laufenden ml 95 - 115 (4.3.2.1) wurden getrennt gepoolt und durch Druckdialyse konzentriert. Die Konzentrate wurden nach der unter 3.2.7.3 beschriebenen Behandlung mit Dodecylsulfat auf Kleinporgel nach der Vorschrift von Glossmann et al (37) getrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.



- Bild 7 SDS-Diskelektrophorese der höhermolekularen Komponente
Aufgetragen: 0,05 ml $\hat{=}$ 0,15 mg Protein

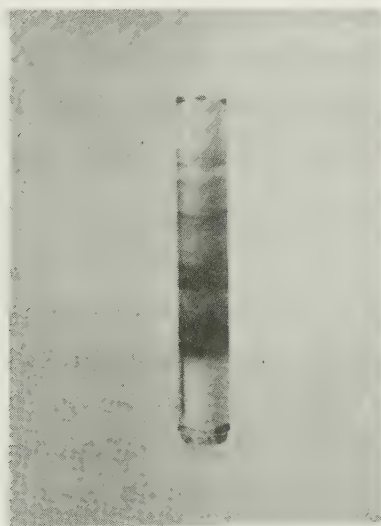


Bild 8 SDS Diskelektrophorese der Komponente mit niedrigerem
Molekulargewicht
Aufgetragen: 0,05 ml $\hat{=}$ 0,13 mg Protein

Die durch Diskelektrophorese des Extrakts auf Mittelporgel (7,5%) erhaltene Trennung (Bild 5) läßt deutlich 2 Proteinbanden erkennen, eine Bande am oberen Gelende, eine zweite breitere Bande etwas darunter. (Die auf den Abbildungen dargestellten Gelgrößen entsprechen dem Original).

Nach Desaggregation des Extrakts mit SDS (3.2.7.3) und anschließender Trennung auf einem 10% Gel sind zwischen 10 und 12 Banden zu erkennen. (Bild 6).

Über den Anteil dieser Banden am Gesamtprotein lassen sich keine genauen Aussagen machen, da wir nicht von der Voraussetzung einer gleichmäßigen Farbbeladung ausgehen können.

Die Verteilung der Proteinbanden in den Komponenten des Extrakts, die durch Gelfiltration an Sephadex G-200 voneinander getrennt wurden, ist gegenüber dem Gesamtextrakt im wesentlichen unverändert. (Bild 7, 8).

4.4 Versuche zur Dissoziation der Proteinkomponenten unter Erhaltung der Aktivität

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, daß die β -OHDH-Aktivität an einen Protein-Phospholipid-Komplex mit einem Molekulargewicht von über 400.000 gebunden ist. Mit den folgenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die Möglichkeit zu einer Dissoziation dieser Proteine unter Verhinderung einer irreversiblen Inaktivierung besteht. Die dazu verwendeten Methoden sind:

- a) Aufschluß mit chaotropen Ionen, Harnstoff, Guanidiniumchlorid
- b) Enzymatische Verdauung
- c) Aufschluß mit Detergentien

Da es sich bei der Präparation um ein lösliches, d. h. nach 1-stündiger Zentrifugation bei 105.000 g nicht sedimentierendes Protein handelt, konnte eine eventuell erfolgte Dissoziation nicht durch ein geändertes Sedimentationsverhalten nachgewiesen werden. Soweit dies möglich war, wurde hierzu die Diskelektrophorese herangezogen.

4.4.1 Die Wirkung chaotroper Ionen sowie Harnstoff und Guanidiniumchlorid

Als Mittel für einen Aufschluß der Proteinkomponenten wurden neben Harnstoff und Guanidiniumchlorid die chaotropen Ionen ClO_4^- und SCN^- verwendet. Die Fähigkeit dieser zuletzt genannten Substanzen zur Spaltung von Membranen wird nach Hatefi et al (45) mit ihrer Wirkung auf die Struktur bzw. Lipophilie des Wassers begründet. Nach Kauzmann (46) ist die Bildung hydrophober Bindungen mehr auf die thermodynamisch ungünstige Wechselwirkung mit Wasser als auf die eigentliche Wechselwirkung zwischen solchen Gruppen selbst zurückzuführen.

Mit SCN^- und ClO_4^- können hydrophobe Bindungen gelöst werden.

Nach Inkubation mit 1 - 6 M Harnstoff-, Guanidiniumchlorid-, SCN^- - und ClO_4^- -Konzentrationen ist die Enzymaktivität des Extrakts nicht mehr reaktivierbar (Methodik s. 3.2.8.1).

Während die Fähigkeit zur Bildung des aktiven Protein-PC-Komplexes durch Zusatz von SCN^- , Harnstoff und Guanidiniumchlorid irreversibel verlorenght, läßt sich der Perchlorat-inkubierte Extrakt nach Dialyse teilweise reaktivieren.

Es wurden bis zu 20% der Ausgangsaktivität erreicht. Diskelektrophoretische Untersuchungen ergaben, daß 6 M Harnstoff die Proteinkomplexe des Extrakts nicht aufspaltet.

4.4.2 Proteolytische Verdauung des Enzyms

Die Endopeptidasen Trypsin, Papain sowie α -Protease haben eine unterschiedliche Wirkung auf das im Extrakt enthaltene Enzym (Methodik siehe unter 3.2.8.2). Wie aus der Tabelle hervorgeht, wird durch Trypsin und Papain das Protein abgebaut; α -Protease greift das Protein nicht bzw. kaum an. Der α -Protease inkubierte Extrakt kann diskelektrophoretisch nicht aufgetrennt werden. Er zeigt dasselbe Verhalten wie der Ausgangsextrakt. (Bild 5).

Tab. 4 Die Änderung der spezifischen Aktivität sowie des Proteingehaltes nach Zusatz proteolytischer Enzyme.

Art der Verdauung	Spez. Aktivität nach Reaktivierung (μ Mol NAD red. $\text{mg Prot.}^{-1} \text{ min.}^{-1}$)	Proteingehalt der Probe nach Verdauung (mg / ml)
Unverdauter Extrakt	0,8	2,7
Trypsin (0,6 mg/ 10 mg Prot.)	0,0	0,7
Papain (1,3 mg/ 10 mg Prot.	0,0	1,8
α -Protease (0,2 mg/10 mg Prot.)	0,4 - 0,6	2,3

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; Tris-Cl-Puffer : 75 mM pH 8,1; T: 25°C;

Protein: 0,17 mg / 2 ml Ansatz

Präinkubationsansatz:

0,27 mg Protein; 20 mM Tris-Phosphat-Carbonatpuffer; 4 mM NAD;
200 mM Thioglycerin; 0,450 mg PC in zusammen 0,5 ml.

4.4.3 Aufschluß mit Detergentien und Alkoholen

Der Extrakt wurde wie unter 3.2.8.3 beschrieben mit den verschiedenen Solubilisierungsmitteln inkubiert. Über die in den Tabellen 5 und 6 angegebenen Detergentien hinaus wurden Digitonin, Natriumdodecylsulfat und Natriumdesoxycholat verwandt. Das Enzym ließ sich in Gegenwart dieser drei zuletzt genannten Substanzen nicht reaktivieren. Dies galt auch nach vorausgegangener Dialyse zur Entfernung des Detergenz.

Durch 10% tert. Amylalkohol (V/V) wird das Apoenzym inaktiviert. Äthanol konnte dagegen bis zu einer Konzentration von 25% ohne Minderung der Aktivität zugegeben werden. Erst bei einem Gehalt von 50% Äthanol ging die katalytische Eigenschaft des Enzyms verloren. Hier war im Ansatz eine starke Trübung zu beobachten. Wie die folgende Tabelle zeigt, ist in Gegenwart verschiedener nichtionischer Detergentien wie Lubrol, Lensodel, Triton, Tween und Eumulgin keine oder kaum eine Reaktivierung zu erreichen, zumindest bei Detergenzkonzentrationen von 1%. Lediglich bei einem Detergenzgehalt von 0,1% ist nach 20-stündiger Inkubation noch eine Reaktivierung mit PC möglich. Bei dem Lensodel NP 40 inkubierten Extrakt wurden zwischen 30-35%, bei Tween 60 5-10% der Ausgangsaktivität erreicht.

Die Untersuchung der detergenzbehandelten Proben mit Hilfe der Diskelektrophorese ließ gegenüber dem Ausgangsextrakt keine Aufspaltung erkennen.

Ganz anders ist das Bild mit Äthylenglykol und seinen Polymerisaten, die, wie Tab. 7 zeigt, eine Stabilisierung bringen.

Tab. 5 Feststellung der Reaktivierbarkeit nach Zusatz von Detergentien. Spez. Aktivität in % der Ausgangsaktivität bei Messung unmittelbar nach Zugabe des Detergenz.

Detergenz	% der Ausgangsaktivität nach Inkubation mit 1% Detergenzkonz. 0,5% Deterg. 0,1% Deterg.		
Lubrol	--	--	10 - 12 %
Lensodel NP 80	--	(schwach)	(schwach)
Lensodel NP 40	--	--	100 %
Triton X 100	--	--	25 - 30 %
Triton X 101	--	--	50 %
Triton X 114	--	--	20 %
Tween 20	4 - 5 %	12 - 15 %	80 %
Tween 60	12 - 15 %	45 - 50 %	90 %
Eumulgin 286	--	--	25 %

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris - Cl pH 8,1; T: 25°C; Protein:
0,35 mg in zusammen 2 ml Ansatz.

Präinkubationsansatz:

0,58 mg Protein; 20 mM Tris-Phosphat-Carbonatpuffer pH 8,1;
4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,450 mg PC in zusammen 0,5 ml.

Tab. 6 Feststellung der Reaktivierbarkeit nach Zusatz von Detergentien.

Spez. Aktivität in % der Ausgangsaktivität bei Messung unmittelbar nach Zugabe des Detergenz.

Detergenz	% der Ausgangsaktivität nach Inkubation mit		
	1% Detergenzkonz.	5% Deterg.	10% Deterg.
Äthylenglykol 1.500 - 1.600	100 %	100 %	100 %
Äthylenglykol 6.000	95 %	90 %	85 %
Äthylenglykol 20.000	100 %	100 %	100 %
Glycerol	100 %	100 %	100 %

Reaktionsbedingungen für den enzymatischen Test:

1 mM NAD; 11 mM BOH; 75 mM Tris - Cl pH 8,1; T: 25°C; Protein:
0,3 mg in zusammen 2 ml Ansatz.

Präinkubationsansatz:

0,5 mg Protein; 20 mM Tris-Phosphat-Carbonatpuffer pH 8,1;
4 mM NAD; 200 mM Thioglycerin; 0,450 mg PC in zusammen 0,5 ml.

Tab. 7 Feststellung der Reaktivierbarkeit nach Zusatz
von Detergentien

Spez. Aktivität in % der Ausgangsaktivität bei Inkubation
nach 20 Stunden.

Inkubation mit Detergenz.

Detergenz	% der Ausgangsaktivität nach Inkubation mit		
	1% Detergenzkonz.	5% Deterg.	10% Deterg.
Äthylenglykol	10 %	80 %	65 - 70 %
Äthylenglykol 1.500 - 1.600	10 %	80 %	100 %
Äthylenglykol 6.000	10 - 15 %	90 %	80 %
Äthylenglykol 20.000	5 - 10 %	90 %	80 %
Glycerol	5 - 10 %	30 - 35 %	30 - 35 %

Die Zusammensetzung des Ansatzes für den optischen Test
sowie des Präinkubationsansatzes siehe S. 54

5.0 Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1) Der alkalische Extrakt der Mitochondrien enthält im wesentlichen 2 Proteinkomponenten. Das Molekulargewicht der kleineren der beiden Komponenten liegt nach den Ergebnissen der Gelfiltration zwischen 4×10^5 und 8×10^5 , das der größeren über 8×10^5 .
- 2) Beide Komponenten besitzen β -OHDH-Aktivität.
- 3) Die Isoelektrischen Punkte dieser Komponenten liegen bei pH 5,4 und 6,8.
- 4) Beide Komponenten sind durch Erhitzen mit SDS spaltbar. Das Molekulargewicht der Spaltprodukte liegt zwischen Werten von 1×10^4 und 6×10^4 .
- 5) Die Komponenten bestehen aus Aggregaten der β -OHDH mit anderen Proteinen.
- 6) Aufgrund der nahezu gleichen spezifischen Aktivitäten und des Proteinmusters ist eine weitgehend identische Zusammensetzung wahrscheinlich.
- 7) Die Inaktivierung der β -OHDH durch Perchlorat ist partiell reversibel.
- 8) In Gegenwart von Detergenz ist das Enzym nicht reaktivierbar. Das Detergenz bewirkt keine Dissoziation der beiden Komponenten.
- 9) Durch Einwirkung von Trypsin und Papain wird die β -OHDH inaktiviert. Im Gegensatz dazu, bildet sich nach Inkubation mit ϵ -Protease der aktive PC-Protein-Komplex.

- 10) Auf der Sepharose 6B-Säule wird das bestehende Gleichgewicht zwischen PC-Protein-Komplex $\rightleftharpoons$ PC + Protein auf die Seite der Dissoziationsprodukte verschoben.

6.0 Diskussion

Die innere Mitochondrienmembran ist ein Multienzymsystem mit hohem Ordnungsgrad (R. Kramar, 11). Die Herauslösung von einzelnen Komponenten aus dieser Membran ist nach S. Penefsky und A. Tzagoloff (13) oft mit einer Denaturierung bzw. mit einer Inaktivierung verbunden. Fleischer et al (17) hat nachgewiesen, daß es sich bei der aktiven Form der β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase sowohl in der inneren Mitochondrienmembran als auch nach Solubilisierung um einen Protein-Lecithin-Komplex handelt.

Durch Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge konnte von uns gezeigt werden, daß die Instabilität des Enzyms nach alkalischer Extraktion aus den Mitochondrien nicht durch Aggregation oder Dissoziation der im Extrakt enthaltenen Komponenten hervorgerufen wird. Die Tatsache, daß eine vollständige Stabilisierung der Aktivität nach Solubilisierung nur durch sofortige Reaktivierung mit Lecithin erreicht werden kann, deutet darauf hin, daß durch PC eine bestimmte Konformation aufrecht erhalten wird. (Die Bindung zwischen Lecithin und dem Protein ist zumindest nicht rein elektrostatischer Natur, wie die Reaktivierbarkeit in Gegenwart hoher (1 M) Kaliumchloridkonzentrationen beweist.) Durch Bindung von Substrat oder Co-substrat am aktiven Zentrum kann keine Stabilisierung herbeigeführt werden.

Aufgrund der bei Untersuchung des Extrakts mit den Methoden der analytischen Ultrazentrifugation sowie der Elektrofocussierung und Gelfiltration festgestellten Mengenverhältnisse der Proteinanteile, können wir sagen, daß die Enzympräparation im wesentlichen 2 Proteinkomponenten enthält, die beide β -OHDH-Aktivität besitzen.

Bei der in der analytischen Ultrazentrifuge zusätzlich auftretenden schnell sedimentierenden Proteinkomponente handelt es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung durch Mitochondrienfragmente, die in den alkalischen Extrakt verschleppt wurden. Für diese Vermutung spricht, daß ihr Anteil am Gesamtprotein, stark schwankt und nie mehr als 15% beträgt.

Da auf der Sephadex G-200-Säule und mit Hilfe der Elektrofocussierung neben den beiden aktiven Komponenten kein Fremdprotein eluiert wird, müssen die angegebenen Fremdproteine (18) (Succinat-Dehydrogenase, NADH-Oxidase und NADH-Transhydrogenase) zumindest in einer der beiden Fraktionen enthalten sein. Die durch Gelfiltration auf Sephadex G-150, G-200 und Sepharose 6B ermittelten Molekulargewichtsbereiche für beide Komponenten lassen jedoch vermuten, daß auch die Proteinfraction mit dem niedrigeren Molekulargewicht keine proteinchemische Einheitlichkeit besitzt, was durch Spaltung der beiden Proteinfractionen mit Dodecylsulfat bewiesen wird.

Die Desaggregation der Mitochondrienmembran geht unter den Extraktionsbedingungen der β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (Gotterer, 18) demnach nicht bis zu der Stufe eines einheitlichen Proteinkomplexes wie bei der Cytochrom-c-Oxidase (Person et al 47, 48).

Im Vergleich zu der spezifischen Aktivität des Ausgangsextrakts wird bei keinem der durchgeführten Trennverfahren eine Anreicherung erzielt, weil der Grad der Reaktivierbarkeit während der Trennungen zu stark abnimmt. Es ist uns nicht gelungen, die Aktivität des Apoenzyms zu stabilisieren.

Die nach 5-minütigem Erhitzen in Gegenwart von 1% SDS erhaltenen Spaltprodukte sind inaktiv. Es wurde deshalb versucht, die im Extrakt enthaltenen Fremdproteine unter Anwendung schonender Methoden von der β -OHDH abzutrennen. Die Nichtreaktivierbarkeit in Gegenwart von Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Thiocyanat und Perchlorat muß nicht bedeuten, daß hier die Inaktivierung mit der Aufspaltung der Proteinkomponenten verbunden ist. Wie die diskelektrophoretische Untersuchung des mit 6 M Harnstoff behandelten Extrakts zeigt, ist die Inaktivierung zumindest in diesem Fall nicht auf eine Spaltung der Proteinkomponenten zurückzuführen. Die lediglich im Falle des Perchlorat-inkubierten Extrakts erreichte teilweise reversible Inaktivierung wird dagegen möglicherweise durch Spaltung des Proteinkomplexes bewirkt. Es gibt aber auch hier die einfachere Deutung, daß in Gegenwart von ClO_4^- die Bildung des aktiven Protein-Lecithin-Komplexes reversibel verhindert wird. Diese Frage wurde deshalb nicht weiter verfolgt, weil der Grad der nach Entfernung des Perchlorats erhaltenen Reaktivierbarkeit zu gering war, als daß hier eine weitere Anreicherung hätte erzielt werden können.

Die durch die Endopeptidasen Trypsin und Papain bewirkte Inaktivierung ist, wie aus der Abnahme der Proteinkonzentrationen in den Ansätzen hervorgeht, eindeutig auf eine proteolytische Wirkung zurückzuführen. Durch Trypsin und Papain werden aktivierbare Apoenzymmoleküle verdaut.

Bei Inkubation des Enzyms mit α -Protease bleibt dagegen die Aktivität und die Konzentration des Proteins im Ansatz erhalten.

Wie die diskelektrophoretische Untersuchung dieses Extrakts zeigt, findet hier keine Aufspaltung statt. Dies beweist, daß der α -Protease, die nach Pfeleiderer et al (49) an hydrophoben Aminosäureresten spaltet, entweder aufgrund des Vorhandenseins von endogenem Lipid oder aber bedingt durch die Struktur der Komponenten kein Zugang zu den entsprechenden Bindungsstellen möglich ist.

Unsere Untersuchungen mit Detergenz bestätigen die Beobachtungen Fleischers (17), der nachgewiesen hat, daß durch amphiphile Substanzen die Bildung des PC-Protein-Komplexes verhindert wird. Wir konnten feststellen, daß mit Erhöhung der Detergenzkonzentration von 0,1% auf 1% die Reaktivierbarkeit des Enzyms abnahm.

Wie die Diskelektrophorese zeigt, wurde durch Zusatz der nicht-ionischen Detergentien zum Extrakt keine Spaltung der Proteinkomponenten hervorgerufen. Es erschien uns deshalb nicht sinnvoll Bedingungen zu suchen, die nach Entfernung des Detergenz eine Reaktivierung erlauben. Bei geringer Detergenzkonzentration (0,1%) konnte bei allen verwendeten Substanzen eine Reaktivierung erreicht werden; im Fall von Lensodel NP 40 bzw. Tween 20 und Tween 60 war diese sogar fast vollständig möglich.

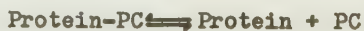
Die Inkubation mit ionischen Detergentien wie Natriumdesoxycholat und Natriumdodecylsulfat brachte ebenso wie bei den nichtionischen eine Inaktivierung. Die Tatsache, daß selbst nach 1-stündiger Inkubation bei 22°C mit Dodecylsulfat keine Aufspaltung erreicht wurde, spricht für eine sehr feste Bindung der einzelnen Proteine innerhalb der beiden Komponenten.

Ganz anders ist das Ergebnis, das mit Polyäthylenglykol und dessen Polymerisaten erreicht wird. Hier ist im Gegensatz zu den ionischen und nichtionischen Detergentien selbst bei 10-facher Detergenzkonzentration (10%) eine nahezu vollständige Reaktivierung möglich. Noch erstaunlicher ist die durch diese Substanzen erzielte Stabilisierung der Aktivität. Nach 20 - 24-stündiger Inkubation in Gegenwart von Polyäthylenglykol 1.500 - 1.600 ist das Enzym voll reaktivierbar. Allerdings ist hier - wie bei allen Polyäthylenglykol-inkubierten Ansätzen - eine zunehmende Trübung im Extrakt zu beobachten.

Deshalb ist die durch Polyäthylenglykol bewirkte Stabilisierung mit der bei einigen Enzymen erhaltenen Stabilisierung durch hohe Ammonsulfatkonzentrationen zu vergleichen.

Die sehr feste Bindung der einzelnen Bestandteile der Protein-komponenten untereinander wird auch nach Wechselwirkung zwischen micellarem Lecithin und dem aktiven Anteil der Komponenten nicht aufgehoben, d. h. die Bindung zwischen PC und dem aktiven Anteil des Proteins bringt keine Desaggregation der Proteinkomponenten mit sich. Aufgrund dessen kann auch mit diesem aktiven Protein-PC-Komplex keine Anreicherung der Aktivität erhalten werden.

Die bei Chromatographie von gleichen Mengen Gesamtaktivität auf Sepharose 2B und 6B erhaltene unterschiedliche Aktivitätsausbeute, kann nur so gedeutet werden, daß auf der 6B-Säule, - nicht jedoch auf der 2B-Säule - das Gleichgewicht



auf die Seite der Dissoziationsprodukte verschoben wird. Die hier beobachtete Veränderung des PC : Proteinverhältnisses

von 11 : 1 auf 1 : 1 liegt im Bereich der K_m für PC (Gotterer, 18) und erklärt, daß sobald eine irreversible Dissoziation des Protein-PC-Komplexes stattfindet, ein Verlust an Gesamtaktivität eintritt. Die Dissoziation ist auf der 6B-Säule - im Gegensatz zur 2B-Säule - deshalb irreversibel, weil hier aufgrund der Porengröße sowohl der aktive PC-Protein-Komplex sowie micellares PC ausgeschlossen wurden, das Protein nach Abspaltung von Lecithin jedoch im Trennbereich des Gels läuft.

7.0 Literaturnachweis

- 1) Green, D.E.; J.G. Dewan; L.F. Leloir; Biochem. J. 31, 934 (1937)
- 2) Lehninger, A.L.; H.C. Sudduth; J.B. Wise; J. Biol. Chem. 235, 2450 (1960)
- 3) Watson, H.R.; D.B. Lindsay; Biochem. J. 128, 53 (1972)
- 4) Grafflin, A.L.; D.E. Green; J. Biol. Chem. 176, 95 (1948)
- 5) Cheldelin, V.H.; H. Beinert; Biochem. Biophys. Acta 9, 661 (1952)
- 6) Lehninger, A.L.; G.D. Greville; Biochem. Biophys. Acta 12, 188 (1953)
- 7) Brodie, A.F.; C.T. Gray; J. Biol. Chem. 219, 853 (1956)
- 8) Jensen, C.O.; W. Sacks; F.A. Baldauski; Science 113, 65 (1951)
- 9) Shuster, C.W.; M. Doudoroff; J. Biol. Chem. 237, 603 (1962)
- 10) Schnaitmann, C.; J.W. Greenawalt; J. Cell Biol. 38, 158 (1968)
- 11) Kramar, R.; Z. klin. Chem. Biochem. 2, 443 (1971)
- 12) Ziegler, D.M.; A.W. Linnane; Biochem. Biophys. Acta 30, 53 (1958)
- 13) Penefsky, H.S.; A. Tzagoloff; in: Methods of Enzymology, . 22, Eds. S.P. Colowick; N.O. Kaplan; New York 1971 S. 204 212
- 14) Sekuzu, I.; P. Jurtshuk; D.E. Green; Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 71 (1961)
- 15) Jurtshuk, P.; I. Sekuzu; D.E. Green; Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 76 (1961)
- 16) Sekuzu, I.; P. Jurtshuk; D.E. Green; J. Biol. Chem. 238, 975 (1963)
- 17) Fleischer, B.; A. Casu; S. Fleischer; Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 189 (1966)
- 18) Gotterer, G.S.; Biochem. 6, 2139 (1967)

- 19) Gotterer, G.S.; Biochem. 6, 2147 (1967)
- 20) Devlin, T.; B. Bedell; J. Biol. Chem. 235, 2134 (1960)
- 21) Klingenberg, M.; H. Häfen; Biochem. Z. 337, 120 (1963)
- 22) Schneider, W.C.; G.H. Hogeboom; J. Biol. Chem. 183,
123 (1950)
- 23) Beisenherz, G.; H.J. Boltze; T. Bücher; R. Czok; K.H.
Garbade; E. Meyer-Arendt; G. Pfeleiderer; Z. Naturforsch.
8b, 555 (1953)
- 24) Bode, C.; H. Goebell; E. Stähler; Z. klin. Chem. Biochem.
6, 418 (1968)
- 25) Lowry, O.H.; B.J. Rosebrough; J.A. Farr; R.J. Randall;
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 26) Wallenfells, K.; M.L. Zarnitz; G. Laule; H. Bender; M.
Keser; Biochem. Z. 331, 459 (1959)
- 27) Kalckar, H.M.; J. Biol. Chem. 167, 461 (1947)
- 28) Hanahan, D.J.; J.C. Dittmer; E. Warashina; J. Biol. Chem.
228, 685 (1957)
- 29) Schnellbacher, E.; unveröffentlichte Ergebnisse
- 30) Debuch, H.; W. Mertens; M. Winterfeld; Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 349, 896 (1968)
- 31) McGilvery, R.W.; in: Methods of Enzymology; Eds. S.P.
Colowick; N.O. Kaplan; New York 1955 S. 546
- 32) Racker, E.; in: Methods of Enzymology; Eds. S.P. Colowick;
N.O. Kaplan; New York 1962 S. 275
- 33) Takemori, S.; E. Furuya; H. Suzuki; M. Katagiri; Nature
215, 417 (1967)
- 34) Schaeg, W.; R. Bingöl; H. Blobel; Biochem. Biophys. Acta
268, 542 (1972)
- 35) Delmotte, P.; Science tools 17, 51 (1970)
- 36) Maurer, H.R.; Disc Electrophoresis, Walter de Gruyter,
Berlin, New York 1971

- 37) Glossmann, H.; F. Lutz; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1583 (1970)
- 38) Brewer, J.M.; Science 156, 256 (1967)
- 39) Weber, K.; M. Osborn; J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
- 40) Hatefi, Y.; K.A. Davis; W.G. Hanstein; Arch. Biochem. Biophys. 137, 286 (1970)
- 41) Zwillling, R.; G. Pfeleiderer; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 519 (1967)
- 42) Krisch, K.; Biochem. Z. 337, 531 (1963)
- 43) Determann, H.; Gelchromatographie, Berlin, Heidelberg, New York (1967)
- 44) Pharmacia fine Chemicals; Sepharose 2B-4B-6B, Uppsala, Schweden, (1969)
- 45) Hatefi, Y.; W.G. Hanstein; Proc. Nat. Acad. Sci. US 62, 1129 (1969)
- 46) Kauzmann, W.; Advanc. Protein Chem. 14, 1 (1959)
- 47) Person, P.; H. Zipper; J.H. Felton; Arch. Biochem. Biophys. 131, 457 (1969)
- 48) Person, P.; J.H. Felton; P.J. O'Connell; H. Zipper; D.E. Philpott; Arch. Biochem. Biophys. 131, 470 (1969)
- 49) Pfeleiderer, G.; A. Kraus; Biochem. Z. 342, 85 (1965)

Dem Dekan der Humanmedizinischen Fakultät

Herrn Prof. Dr. Hj. Staudinger

sowie

Herrn Prof. Dr. Dr. L. Lumper

danke ich, daß sie mir die Möglichkeit gegeben haben,
die vorliegende Dissertation in ihrem Arbeitskreis an-
zufertigen. Sie haben stets durch Diskussion und Anre-
gung Anteil an der Durchführung der Arbeit genommen.
Weiterhin danke ich Herrn Stumpf, Herrn Thiele, Frä.
Hofmann und Herrn Balser für die technische Assistenz.



Lebenslauf

Am 13. Februar 1943 wurde ich als erstes Kind des kaufmännischen Angestellten Karlheinz Gratz und dessen Ehefrau Hildegard, geb. Hüther, in Philippsthal/Werra geboren.

Wie meine Eltern und Geschwister, Dieter und Hannelore, bekenne ich mich zum evangelischen Glauben.

Nach Besuch der Volksschule - Einschulung Ostern 1949 - trat ich im März 1953 in die Werratalsschule in Heringen ein, die ich im März 1962 mit dem Abitur abschloß.

Mein Studium habe ich im Sommersemester 1962 an der Hochschule für Erziehung in Gießen aufgenommen. Im Wintersemester 1964/65 wechselte ich zur Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Am 18. Oktober 1967 legte ich die Vorprüfung in Pädagogik ab; im Herbst 1969 das Staatsexamen in Biologie und Chemie. Meine Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation habe ich am 15. März 1970 im Biochemischen Institut aufgenommen.

Ich bin seit dem 23. 12. 1971 mit Petra, geb. Möller, verheiratet.

Am 12. Oktober 1907 wurde ich als erstes Kind des Ehepaars
 August Hermann und Marie (geb. Schmidt) geboren.
 Mein Vater war Kaufmann, meine Mutter Hausfrau.
 Ich besuchte die Volksschule in Berlin von 1913 bis 1921.
 Nach dem Abitur am 1. Juli 1921 trat ich in die
 Reichsheimwehr ein und wurde zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1922 wurde ich zum Leutnant ernannt.

Am 1. Oktober 1923 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1924 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1925 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1926 wurde ich zum Leutnant ernannt.

Am 1. Oktober 1927 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1928 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1929 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1930 wurde ich zum Leutnant ernannt.

Am 1. Oktober 1931 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1932 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1933 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1934 wurde ich zum Leutnant ernannt.

Am 1. Oktober 1935 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1936 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1937 wurde ich zum Leutnant ernannt.
 Am 1. Oktober 1938 wurde ich zum Leutnant ernannt.

